مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد (17) العدد (3) – (2017)
ISSN-1813-1646

التشخيص المظهري والجزيئي للإصابة بفطريات المايكورايزا لنباتات مختلفة نامية في ترب جبسية

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

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

الخلاصة

اجريت دراسة مسحية في محافظة صلاح الدين – جامعة تكريت لتشخيص فطريات المايكورايزا للنباتات النامية في كلية الزراعة للعام 2014 ، جمعت العينات النباتية بشكل عشوائي من ستة مواقع تربتها مختلفة من حيث النسجة و الصفات الكيميائية و الفيزيائية و الخصوبية ، اشتملت على (10) نباتات من عوائل نباتية مختلفة (الذرة الصفراء *Zea mays* والشعير *Hordeum vulgare* و الحنطة *Triticum aestivum* والبصل *Allium cepa* و الباقلاء *Vicia faba* و بزاليا *Lathyrus odoratus*L. و الحمص *Cicer Linnaeus* و الجت *Medicago truncatula* و الحندقوق *Melilotus officinalis* و الحبة السوداء *Nigella sativa*) وكان العدد الكلي للعينات (25) عينة جذور نبات مع التربة المحيطة بها، اظهرت النتائج ، إن أعلى نسبة إصابة بفطريات المايكورايزا كانت في نباتي الذرة الصفراء و البصل 60 % لكل منهما، في حين كانت أقل نسبة إصابة في نباتي الحندقوق والجت إذ بلغت نسبة الإصابة فيها 22.5، 15 % ، 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 هذه الجينات بتقنية الـ PCR ، أظهرت النتائج بأن البادىء 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 .

الكلمات المفتاحية : تشخيص فطريات المايكورايزا ، نسبة إصابة ، ترب جبسية، تقنية PCR، جذور نباتات .

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

Morphological and Molecular Identification of Mycorrhizal Fungi Infection for Several Plants Grown in Gypsiferous Soil

Salahuldeen H. Altai*; Abedulkareem E. Alkurtany* and Hameed M. Jasim**
* College of Agriculture/Tikrit University ** College of Applied Biotechnology/ Al-Nahrain University

ABSTRACT

A field survey was conducted in Tikrit University, Salah Al-din governorate to Identify Mycorrhizal Fungi for grown Plants in College of Agriculture on 2014, The plant samples are collected randomly from 6 Locations different in there Texture , Chemical , physical and Fertilize Characteristics , included (10) different plant families (Corn- *Zea mays* , Barley- *Hordeum vulgare*, Wheat- *Triticum aestivum* , Onion- *Allium cepa* , Bean- *Vicia faba* , Peas- *Lathyrus odoratus*L., Chick-peas- *Cicer Linnaeus* , Alfalfa- *Medicago truncatula* , Spotted medic- *Melilotus officinalis* , - *Nigella sativa*) the total number of samples (25) contained root plant and there surrounding soil (Rhizosphere) The results showed :The highest Percentage of VAM infection presente in Corn and Onion which was 60% for each one , while the less Percentage of VAM infection presence in Spotted medic , Alfalfa , it was 22.5 , 15% respectively,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 showed that the nucleus primer NS1 was very accurate to Identify the Mycorrhizal fungi infection in the plant root and different between the infected and non-infected root.

Key words: Morphological and Molecular Identification, Mycorrhizal Fungi Infection, Plants, Gypsiferous Soil.

Correspondence:
Salahuldeen H. Altai
The Soil & Water Resources Dept.- College of Agric.- Tikrit Uni. – **IRAQ**.

[1] البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

المقدمة :

المايكورايزا (Mycorrhiza) مصطلح لاتيني يتكون من مقطعين وهما (Mykes) ومعناه الفطر Fungus و (rhiza) ومعناه الجذر root ، ويعد العالم الألماني Frank أول من أطلق مصطلح المايكورايزا (فطر_ جذر) عام 1885 ، وذلك لوصف العلاقة التكافلية بين هذا النوع من الفطريات وجذور النباتات Harley (1978)، وهي علاقة مفيدة في تشجيع نمو النبات و زيادة انتاجه Mosse(1977) فتبدو بذلك النباتات المصابة بها بحالة أفضل من النباتات غير المصابة ، وتدخل هذه الفطريات ضمن تقانات انتاج الاسمدة الحيوية Biofertilizer التي تعد مصدراً غذائياً للنبات رخيصة الثمن جداً و مأمونة من الناحية البيئية وصحة الانسان إذا ما قورنت بالاسمدة المعدنية (Parial وجماعته ،2014) ، فضلاً عن ان هذه العلاقة تزيد من كفاءة استخدام الاسمدة الكيمياوية في الترب الفقيرة بالمغذيات كالترب الجبسية (الكرطاني و الطائي،2011) و تزيد مقاومة النبات للأمراض والكثير من العوامل البيئية كالانجماد و الملوحة (Chen وجماعته ،2014) و زيادة مقاومة النبات للجفاف (حميد ،2015) وتعزز نموه وذلك بزيادة امتصاص العناصر المغذية للنبات ولاسيما الفسفور والعناصر الصغرى مثل الزنك والنحاس و المغنيسيوم (الطائي ، 2016) .

تتميز هذه الفطريات بانها اجبارية المعيشة على النسيج الحي اي لا يمكن تنميتها على الاوساط الصناعية مثل باقي الفطريات و البكتريا الا بوجود جذر لنبات حي ، ولا يمكن تشخيص الإصابة بفطريات المايكورايزا إلا عن طريق تصبيغ جذور النبات بصبغات خاصة تدل على وجود هايفات هذه الفطريات، لذلك استخدامت التقنيات الحديثة في تشخيص الاصابة و منها تقنية الهندسة الوراثية PCR لمعرفة الجذور المصابة و غير المصابة بفطريات المايكورايزا و مصطلح (PCR) هو مختصر لثلاث كلمات Polymerase Chain Reaction تفاعل السلسلة البوليمرية وذلك باستخدام بادئ مصمم لتضخيم تسلسلات متكررة بشكل خاص في منطقة جينات الرايبوسومات في منطقة خارجية كروموسومية Tandem repeats in extrachromosomal circuler rDNA في شريط DNA Harrier (2001) وبذلك يمكن التعرف على وجود DNA لفطريات المايكورايزا في الدنا المجيني المستخلص من النبات ، هدفت الدراسة الى :-

- تشخيص الجذور المصابة و غير المصابة بفطريات المايكورايزا بتقنية (PCR)
- تشخيص الجذور المصابة و غير المصابة بفطريات المايكورايزا بالطريقة التقليدية (التصبيغ)
- تحديد افضل عائل نباتي في مواقع المسح سجلت فيه اعلى نسبة اصابة بفطريات المايكورايزا.

المواد و طرائق 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 ، شملت على اثنتي عشر نبات من عوائل نباتية مختلفة 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 وقت اخذ العينة) ، و يوضح الجدول (1) بعض الصفات الفيزيائية والكيمائية لتربة مناطق المسح المدروسة و الجدول (4) يبين النباتات التي شملها المسح الحقلي .

تشخيص الاصابة بفطريات المايكورايزا:

شخصت الاصابة بفطريات المايكورايزا للنباتات النامية في موقع الدراسة بطريقة Vinegar and Ink حسب ما ذكر Vierheiligوجماعته (1998) وأجريت كما يأتي:

1- وضعت القطع الجذرية (طول القطعة الواحدة 1سم) في أنابيب اختبار معقمة ونظيفة.

2- غسلت هذه القطع من بقايا الطين والأتربة العالقة بها.

3- أضيف محلول هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز (10 %) ثم وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 م ولمدة 3الى 5 دقيقة.

4- غسلت القطع الجذرية بالماء الاعتيادي بعد استخراجها من الحمام المائي.

5- أضيف محلول حامض الخليك (5%) لقطع الجذور لمدة 2الى 3دقائق.

6- أضيف محلول صبغة Ink and Vinegar لكل انبوبة من انابيب الاختبار ثم وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 م لمدة 4 – 5 دقائق.

7- غسلت النماذج بالماء المقطر بعد استخراجها من الصبغة لتهيأتها للفحص المجهري.

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	220.
رملية طينية	7,81	2.25	210	61.4	9.2	29.4

التشخيص الجزيئي لفطريات المايكورايزا :

شخصت الجذور النباتية المصابة وغير المصابة بفطريات المايكورايزا جزيئيا بتقنية الPCR وذلك بالتحري عن جين rDNA18S للفطر في جذور نباتات الذرة الصفراء، 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 وجماعته ،2008) وكما يأتي:

استخلاص الدنا المجيني (DNAExtraction of genomic)

اجريت عملية استخلاص الدنا المجيني من جذور نباتات الذرة الصفراء وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Ausubel (1999) .

تقدير نقاوة وتركيز الدنا (Maniatis وجماعته ، 2001) :

تم تقدير التركيز والنقاوة للDNA 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 TBEالدارئ (1X) ، أجريت عملية الترحيل الكهربائي بتحميل نماذج الدنا في حفر الهلام ، ووضع في احدى حفر الهلام معلم الدنا (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 نباتات الذرة الصفراء (Van Tuinen وجماعته ،1998):

أجريت عملية تضخيم جينrDNA18Sبتقنية الـ PCR بأستخدام باديء نكليوتيدي متخصص لهذا الجين ، وقد تم الحصول عليه بهيئة مجففة (lyophilized form) ليتم اذابته في الماء المقطر المعقم لأعطاء تركيز نهائي مقداره 10 بيكومول/مايكروليتر .

الباديء:

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 جينrDNA18S للمايكورايزا مع الباديء 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 الباديء NS1 بتركيز 10 مايكرومول

0.8 مايكرولتر من محلول الباديء 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 .

تضمن مزيج التفاعل لتضخيم جينrDNA18Sللمايكورايزا بتقنية الـ PCR كل من المواد المبينة اعلاه. سحبت هذه المواد بأستخدام ماصة دقيقة ونقلت الى انابيب ابندورف بلاستيكية سعة 1.5 مل لاجراء التفاعل.

مزجت 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) ،و اجري تفاعل التضخيم وفق البرنامج الحراري المبين في الجدول (3)

جدول (3): 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 .

النتائج والمناقشة :

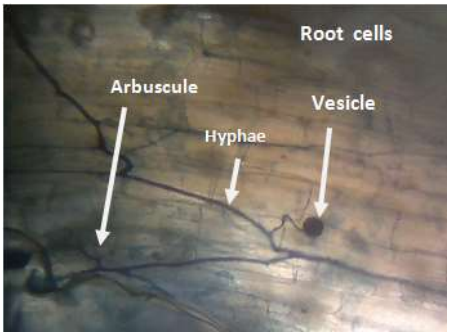
نتائج المسح الحقلي :

يبين الجدول (4) نسبة الإصابة بفطريات المايكورايزا VAM للنباتات النامية في مواقع مختلفة من جامعة تكريت ، ويظهر بإن أعلى نسبة إصابة بفطريات المايكورايزا كانت في نباتي الذرة الصفراء و البصل 60 %، للنباتين على التتابع ،و 57.5 % لنباتي الحنطة و الشعير و 58 % للحبة السوداء و 50% للباقلاء و البزاليا و 40% لنبات الحمص ، في حين كانت أقل نسبة إصابة في نباتي الحندقوق والجت إذ بلغت نسبة الإصابة فيها 22.5، 15 % ، على التتابع ، ان فطريات المايكورايزا تصيب عدد كبير من النباتات و لكن هناك افضلية في اصابة النبات العائل، وهذا التفضيل قد يعزى الى طبيعة جذور النبات العائل فان فطريات المايكورايزا تفضل اصابة الجذور الليفية اكثر من الجذور الوتدية او الى سمك طبقة القشرة للجذر Akbar (2007).

جدول (4) نسبة الإصابة بفطريات المايكورايزا VAM للنباتات المزروعة و الادغال لمواقع مختلفة من جامعة تكريت

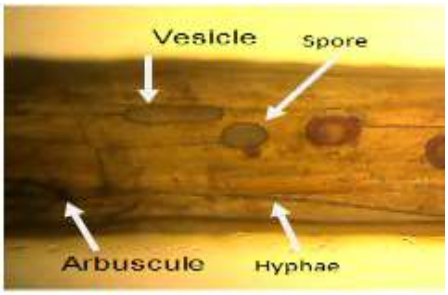
ت	النبات العائل (Host plant)	نسبة الاصابة بالمايكورايزا %
.1	الذرة الصفراء (*Zea mays*)	60
.2	البصل (*Allium cepa*)	60
.3	الحنطة(*Triticum aestivum*)	57.5
.4	الشعير(*Hordeum vulgaris* L.)	57.5
.5	الحبة السوداء (*Nigella sativa*)	58
.6	الباقلاء (*Vicia faba*)	50
.7	البزاليا(*Lathyrus odoratus*L.)	50
.8	الحمص (*Cicer linnaeus*)	40
.9	الحندقوق(*Melilotus officinalis*)	22.5
.10	الجت(*Medicago truncatula*)	15

يوضح الشكل (1) جذر نبات الذرة الصفراء (عند مرحلة التزهير) مصاب بفطريات المايكورايزا مصبغ بصبغة Ink and Vinegar . اذ يظهر وجود التراكيب الشجيرية Arbusculer و التراكيب العديسية Vesculer صغيرة الحجم جداً و قليلة العدد تنتشر بين خلايا القشرة لجذر النبات و تمتد هايفات الفطر Hyphae طويلة وقطرها صغير جدا ممتدة على طول الجذر غير مقسمة و متفرعة وهذا الشكل يطابق الاصابة بفطر *G. intradeces* وهذا يتماشى مع ما ذكره Alkan وجماعته (2004)



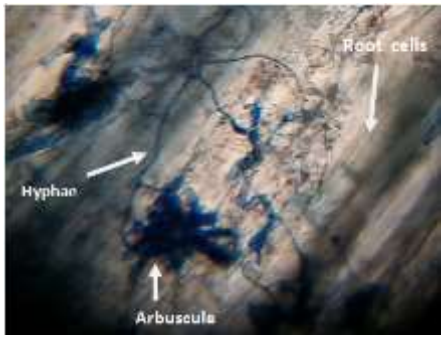
الشكل (1) جذر نبات الذرة الصفراء مصاب بفطريات المايكورايزا مصبغ بصبغة Ink and Vinegar

يبين الشكل (2) شعيرة جذرية لنبات البصل مصاب بالمايكورايزا و يظهر وجود عديسات كبيرة الحجم و التراكيب الشجيرية مرتبطة بالهايفات الممتدة على طول الشعيرة الجذرية مع وجود سبورات وهذه الاصابة تطابق شكل الاصابة بفطر المايكورايزا *Glomus mossea*حسب ما ذكره Brundrett (2004)



الشكل (2) شعيرة جذرية لنبات البصل مصاب بالمايكورايزا مصبغ بصبغة Ink and Vinegar

يظهر من الشكل (3) وجود هايفات متفرعة مع وجود التراكيب الشجيرية فقط و غياب العديسات وهذا قد يعزى الى ان جنس فطر المايكورايزا الذي احدث الاصابة يكون عدد قليل من العديسات او قد يعود الى عمر الاصابة بالفطر لان فطريات المايكورايزا تكون في بداية الاصابة هايفات ممتدة داخل الجذر و بعدها تكون التراكيب الشجيرية وعند تقدم الاصابة تكون العديسات و السبورات و هذا يتفق مع ما ذكره Brundrett وجماعته (1985)



الشكل (3) شعيرة جذرية لنبات البصل مصاب بالمايكورايزا مصبغ بصبغة Ink and Vinegar

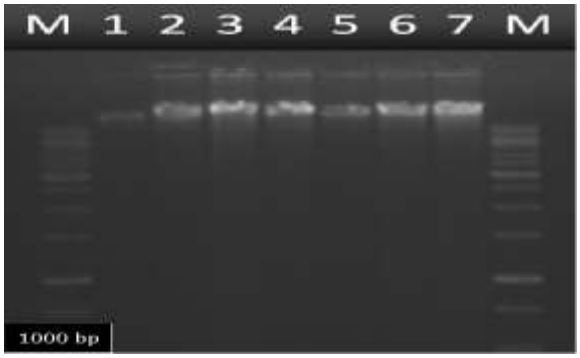
ان هذه الطريقة تعد من الطرائق البسيطة و السريعة للكشف عن اصابة الجذور بفطريات المايكورايزا لتوفر موادها و عدم استخدام مواد كيميائية خطرة فيها ، ولكن في بعض الاحيان لا يمكن تمييز فطريات المايكورايزا عن باقي الفطريات ، فضلا عن صعوبة تحديد جنس و نوع الفطر بالتشخيص المظهري (Vierheilig و جماعته ،2005).

أستخلاص الدنا المجيني من جذور نبات الذرة :

أستخلص الدنا المجيني (Genomic DNA) لفطريات المايكورايزا من الجذور النباتية لعدد من النباتات 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 (4) 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 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 PCR.



الشكل (4): 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 سيطرة خالي من DNA

المسار (2–7): عينات الدنا (DNA) المستخلص من جذور نباتات الذرة الصفراء

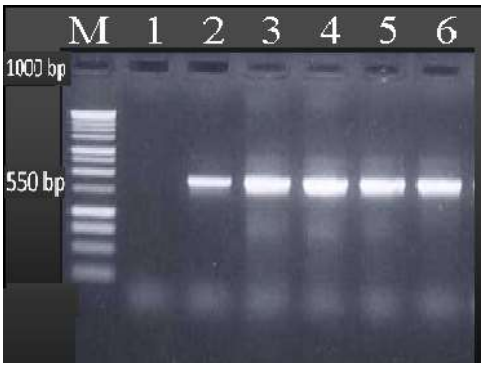
تضخيم جين 18S rDNA :

استكمالا للتشخيص المظهري والكيموحيوي لفطر المايكورايزا المصاحب لاصابة جذور النباتات ، 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 البادىء NS1

تشير نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الأكاروز (2%) باستخدام البادئ النكليوتيدي NS1 الى انه قد تم الحصول على حزم DNA بحجم 550 زوج قاعدي تمثل حجم المنطقة التي تم تضخيمها بأستخدام هذا البادىء وكما مبين في الشكل (5). 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 فأن البادىء 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 .

أن نجاح البادئ NS1 المتخصص المستعمل في كشف وتضخيم الـ DNA لفطريات المايكورايزا يعود الى ان هذا البادئ مصمم لتضخيم تسلسلات مترادفة توجد بشكل خاص في منطقة جينات الرايبوسومات في شريط DNA وكما هو مبين من قبل Harrier ،2001. وبذلك يمكن التعرف على وجود الدنا لفطريات المايكورايزا ضمن الدنا المجيني المستخلص من النبات المصابة بفطريات المايكورايزا.



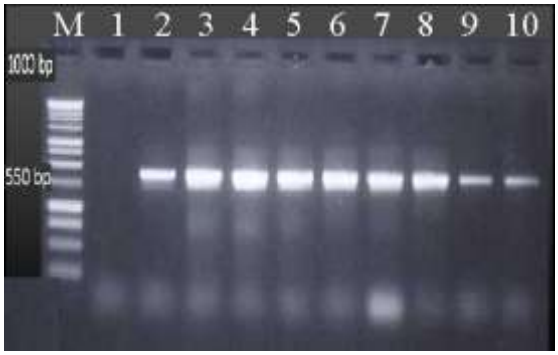
الشكل (5): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم الدنا المجيني لفطريات المايكورايزا المستخلص من جذور نبات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز 2% لمدة ساعة بفولتية مقدارها 70 فولت باستخدام البادئ NS1. اذ ان:

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

التشخيص الجزيئي لعزلات المسح الحقلي :

تمت عملية التشخيص الجزيئي لفطر المايكورايزا المعزول من عينات المسح الحقلي شملت جذور نباتات البصل والشعير والحنطة والباقلاء والبزاليا والحمص والحبة السوداء والحندقوق والجت المبينة في الجدول (6) والتي أخذت من مواقع زراعية مختلفة في جامعة تكريت .

تشير نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (2%) لنواتج تضخيم جين الـ 18S rDNA باستخدام البادئ NS1 للعينات المدروسة والمبينة في الشكل (6) الى ظهور حزمة دنا بحجم جزيئي مقداره 500 زوج قاعدي تمثل حجم جين18S rDNA لفطر المايكورايزا.



الشكل (6): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين الـ 18S rDNA لفطريات المايكورايزا المستخلص من جذور نباتات المسح الحقلي **على هلام الاكاروز بتركيز 2% 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 (سيطرة)
المسار (2– 10): نواتج تضخيم لدنا مستخلص من جذور نباتية مصابة بفطريات المايكورايزا هي البصل، الشعير ، الحنطة ، الباقلاء ، البزاليا ، الحمص ، الحبة سوداء ، الحندقوق والجت

و يمكن تشخيص جنس فطريات المايكورايزا بطريقة nested PCR باستخدام الباديء AML1 مع باستخدام نواتج التفاعل الاول مع الباديء NS1 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). وتعد هذه الطريقة دقيقة جدا في تحديد جنس المايكورايزا عند صعوبة تمييز الاجناس بالطريقة التقليدية سواء كانت

في الجذور ام في السبورات علما بانه لا يمكن حصول التضخيم مع الباديء الثانيAML1 عند عدم حصول التضخيم مع الباديء الاول NS1 (Diédhiou1 و جماعته، 2014) .

المصادر :

حميد ، سجى صبيح .2015. دور التلقيح بالمايكورايزا واضافة السماد البوتاسي في نمو الذرة الصفراء *Zea maysL.* تحت مستويات رطوبية مختلفة . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

الطائي ، صلاح الدين حمادي مهدي .2016.عزل فطريات المايكورايزا و تشخيصها جزيئياً و اختبار كفاءتها في تحمل الذرة الصفراء للجفاف . اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة تكريت.

الكرطاني، عبد الكريم عريبي سبع وصلاح الدين حمادي مهدي الطائي.2011. تأثير التسميد الحيوي بفطر المايكورايزا (*Glomusmosseae*) والتسميد العضوي بحامض الهيوميك Humicacid والتسميد الكيميائي في بعض صفات النمو لنبات الذرة الصفراء النامية في تربة جبسية. المؤتمر العلمي الخامس لكلية الزراعة. جامعة تكريت. للفترة 26-27 نيسان.

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

Alkan N. , Gadkar V. , Coburn J. , Yarden O. and Kapulnik Y. 2004. Quantification of arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intradices* in host tissue real-time Polymerase Chain Reaction .

Ausubel F.M. ; Brent R. ; Kinkgston R.E. ; Moore D.D. , Seidman J.G. , Smith J.A.&Struhl K. ,1999.Short protocols in Molecular Biology.John Wiley and Sons . New York.

Brundrett M. C. 2004.Diversity and classification of mycorrhizal association . Biol Rev 78:473-495.

Brundrett M. C.Piche Y. and Peterson R.L.1985.Developmental study of the early stages in Vescular Arbuscular mycorrhiza formation .Can J. Bot.63:184-194.

Chen, X.; Song F.; Liu F.; Tian C.; Liu S.; Xu H.and Zhu X.2014. Effect of Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Physiology of Maize at Ambient and Low Temperature Regimes .Sci.World J. Article ID 956141:1- 7.

Diédhiou1,Abdala Gamby: Wardsson Lustrino Borges: Oumar Sadio and Sergio Miana de Faria:2014. Assessment of DNA extraction methods for detection of arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots by nested-PCR *Acta Scientiarum.* Bio.Sci. Maringá, : 36(4). 433-441.

Harley ,J. L. 1978. Ectomycrrhizas as nutrient absorbing orgns proc Roy. Soc. London . B.203:1-21

Harrier,L.A.2000.The arbuscular Mycorrhizal Symbiosis,a Molecular review of the fungal dimension . Jo. Experimental Botany. UK.(52):469-478.

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.

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.

Parial R.; Mohajan S.; Hussain M.T.; Hashem M.; Manisha D.and Islam M. 2014. Isolation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and evaluation its effect on plant growth over chemical fertilizers for better human health,SMU.Med.J. 2(1):1604-2349.

Stockinger, H.; Walker C, & Schüßler A.2009. *Glomus intraradices,* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research is not *Glomus intraradices* . New Phytologist 183: 1176-1187.

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.

Vierheilig,Horst;Peter Schweiger and Mark Brundrett.2005.An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in root . Physioligia Plant arum.125:393-404.