Agriculture College – Wasit University

Dijlah Journal of Agricultural Sciences

ISSN 2790 – 5985
eISSN 2790 – 5993

Dijlah J. Agric. Sci.، 3(3):132-145, 2024

The effect of some microorganisms on exDNA traps of lettuce roots *Lactuca sativa*

Amnah Saeed Abd Joda Al-Mossawi and Maha Ali Abd Al-Amir

Department of Biology, College of Science, Al-Qadisiyah University, Iraq

Corresponding author:amnahsaeedabd@gmail.com

Abstract:

The study was done in the winter of 2023-2024 in the wooden canopy of the College of Science/University of Al-Qadisiyah with the aim of investigating the effect of some microorganisms on the Root Extracellular Traps of the root environment of lettuce plants. The study included the isolation of two types of fungi, one of which is pathogenic, which is *Aspergillus niger*, which was isolated from soil samples by dilution series, and the other is a beneficial fungus, which is *Trichoderma spp*. It was also isolated from the soil by dilution series. Five seeds were planted per pot at a depth of 1.5 cm in 2 kg plastic pots filled with a mixture of soil and peat moss (1:1). After the lettuce sprouted, each seedling was transferred to a separate plastic pot. Extracellular DNA was isolated and extracted from the lettuce roots with and without fungi in the laboratories of Al-Qadisiyah University/College of Science. The results showed that deoxyribonucleic acid secreted from the root border cells is indeed present, as the DNA is secreted in the root periphery. The laboratory results confirmed the presence of mitochondrial DNA, plastid DNA, and plant DNA in lettuce *Lactuca sativa*. Real-time PCR technology was used to detect the amount of extracellular DNA secreted for each treatment. *Trichoderma spp.* Results similar to the condition of the plant without addition, while the percentage of extracellular DNA decreased in the presence of the fungus *Aspergillus niger.*

Keywords: *Aspergillus niger, Trichoderma spp, exDNA, roots*

Received:13/8/2024 **Accepted:15/8/2024** **Published:15/11/2024**

تأثير بعض الأحياء المجهرية في مصائد الحامض النووي خارج الخلوي exDNA Traps لجذور نبات الخس *Lactuca sativa*

آمنة سعيد عبد جودة الموسوي و مهـــا علي عبد الأمير

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة القادسية

الخلاصة:

نُفذت الدراسة في شتاء 2023-2024 في الظلة الخشبية لكلية العلوم/ جامعة القادسية بهدف التحري عن تأثير بعض الأحياء المجهرية في المصائد الجذرية الخارج خلوية Root Extracellular Traps لبيئة الجذر لنبات الخس حيث تضمّنت الدراسة عزل نوعين من الفطريات أحدهما مرضي وهو فطر *Aspergillus niger* عُزل من عينات تربة عن طريق سلسلة التخافيف، والأخر أحد الفطريات المُفيدة وهو فطر *Trichoderma spp*. تم عزله كذلك من التربة عن طريق سلسلة التخافيف، كما وقد تمت زراعة 5 حبوب لكل أصيص على عمق 1.5 سم في أوعية بلاستيكية سعة 2 كغم مملوءة بمزيج

التربة والبتموس (1:1) وبعد إنبات الخس تم نقل كل شتلة بوعاء بلاستيكي منفرد، تم عزل وإستخلاص الحامض النووي خارج الخلوي من جذور الخس مع الفطريات ومن دونها في مختبرات جامعة القادسية/كلية العلوم ثم بينت النتائج: إن الحامض النووي deoxyribonucleic acid والمُفرز من الخلايا الحدودية للجذر موجود بالفعل حيث يتم إفراز الحامض النووي في محيط الجذر وأكدت النتائج المختبرية على وجود الحامض النووي المايتوكندري (للميتوكوندريا) والبلاستيدي (للبلاستيدة) والحامض النووي للنبات في الخس *Lactuca sativa* كما وقد تم استخدام تقنية Real-time PCR للكشف عن كمية الحامض الخارج خلوي المُفرز Extra Cellular DNA لكل معاملة وقد أظهر فطر *Trichoderma spp*. نتائج مُقاربة لحالة النبات من دون إضافة بينما أنحسرت نسبة الحامض النووي الخارج خلوي بوجود فطر *Aspergillus niger* .

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus niger, Trichoderma spp, exDNA، الجذور*

المقدمة:

حظيَّت مواضيع البيئة والدراسات البيئية بإهتمام الرأي العام في العقدين الأخيرين، حيث تناولت الدراسات قضايا البيئة ومشكلاتها والتلوث البيئي خاصة بعدما باتت التربة والهواء والموارد الغذائية ملوثة بشتى أنواع المواد الكيميائية والسموم والذي أسهمت بدورها بشكل كبير بزيادة الأمراض ولأجل ذلك أتجه الباحثين في مجال العمل الميداني إلى البحث عن بدائل تعزز نمو النبات ومقاومته لمسببات الأمراض كما أنها تؤدي إلى التقليل من إستخدام المُبيدات الكيميائية وأثارها (Jones et al., 2013) حيث وجد أن جذور النباتات تتعرض للإستعمار من قَبل الكائنات الحية الدقيقة بإستمرار في طبقة المحيط الجذري Rhizosphere على وجه التحديد إذ تحتوي مسام التربة في هذه المنطقة على العديد من البكتريا والكائنات الدقيقة الأخرى (Hutsch et al., 2002) وتعرف منطقة المحيط الجذري على أنه نظام بيئي معقد يشمل طبقة التربة القريبة من السطح والتي يتم فيها تبادل النواضح (Gregory, 2008) ومن خلال آليات تشمل الحركة والإرتباط بواسطة الميكروبات والإمداد الفعال بالمغذيات عن طريق جذر النبات تفرز الجذور مركبات ذات وزن جزيئي عالي مثل السكريات والأحماض بما في ذلك الأمينية والعضوية والفينولات والإنزيمات في منطقة الجذور حيث تعمل هذه الأحماض العضوية والسكريات كمصدر للكربون بينما تعمل الأحماض الأمينية كمصدر للنيتروجين بالتالي تعمل نواضح الجذور على تغيير الخصائص الفيزيائية والكيميائية للتربة والتي بدورها تساهم في جعل التربة موطنًا مناسبًا للنبات (Jan et al., 2011; Van Baarlen et al., 2007) وُجِدَ أن خلايا المضفوفة الجذرية أو ما تُسمى بخلايا الحدود أو الحدودية Border cells تمتلك قُدرة على الإفراز متمثلة بشكل مادة هُلامية حاوية على بروتينات وسُكريات وحامض نووي خارج خلوي extracellular DNA ثُبت أنه يساهم في الدفاع عن طريق تكوين مصائد لمحاصرة مسببات الأمراض (Tran et al., 2016) و هدف البحث هو التحري عن مصائد الحامض النووي الخارج خلوي Extra cellular DNA Rets في جذور نبات الخس وتحديد مصدر الحامض النووي المُفرز ودراسة تأثير بعض الأحياء المجهرية في مصائد النووي الخارج خلوي ExDNA Rets في جذور نبات الخس.

تحتوي النباتات على نسيج قمي جذري RAMs على طرف الجذر حيث يُعد هذا النسيج منطقة حيوية تتحكم باللإنقسام والتمايز الخلوي (Motte et al., 2019) ولأن الجذور تتعرض بإستمرار إلى ضغوطات حيوية وغير حيوية أثناء الإستطالة في التربة (Suzuki et al., 2014; Ganesh et al., 2022) ومن بين عوامل الضغط هجوم مسببات الأمراض الذي يعد السبب الأول في موت النباتات الصغيرة (Atkinson and Urwin 2012) وذلك لأن هذا الجزء من الجذر يكون غير محمي بطبقة سميكة نظرًا لزيادة إستطالته من أجل توغل النبات في أعماق التربة وتثبيته (Tran et al., 2016) ولهذا تقوم النباتات بإيقاف وصّد مسببات الأمراض أو التخفيف من غزوها عن طريق تجنيد الأحياء الدقيقة المتعايشة والمرتبطة بالجذور عن طريق إفرازات جذرية مختلفة (Badri and Vivanco 2009) وذلك عن طريق وجود نوع من الخلايا المفككة في أنسجة الجذر وتكون ذات قدرة إفرازية تُعرف بالخلايا الحدودية أو مضفوفة الجذر، تقوم هذه الخلايا بالدفاع عن طريق إفراز المادة الهلامية الحاوية على البروتينات والسكريات المتعددة والحامض النووي التي تنتجها، مما يؤدي إلى ترسب هذه المادة التي تفرزها وبالتالي يعمل هذا الحامض النووي خارج الخلوي في المساهمة بعملية الدفاع عن طريق تكوين مصائد لمحاصرة المادة المسببة للأمراض الجذرية تسمى بالمصائد الخارج خلوية (Tran et al., 2016) تشمل رواسب الجذور على مركبات قابلة للذوبان في الماء ومتطايرة تطلقها الجذور وتشارك في الدفاع البيولوجي حيث يتكون غطاء من خلايا حدود الجذر وخلايا شبيهة بخلايا الحدود والتي تغطي الأنسجة الحيوية للقمة الجذرية حيث يطلق على الخلايا الحدودية والشبيهة بالحدود اسم AC-DCs (Hawes and Lin 1990; Hawes, 2003) حيث كشفت الدراسات إن هذه الخلايا تبقى على قيد بعد إطلاقها من غطاء الجذر (Hawes and Pueppke, 1986) لذا فأن مصائد

الحامض النووي الخارج خلوي ما هي إلا آلية دفاعية تجاه مسببات الأمراض تترسب خلال التربة وتكون ناتجة ومُفرزة من قِبل مضفوفة الجذر على شكل مادة هلامية مع بروتين وسكريات متعددة بوجود العديد من الخلايا الحدودية فإنها تنتج بدورها كميات كبيرة من المادة الهلامية او مخاطية الحاوية على السكريات الحامض النووي والبروتين الممثل بالـ proteoglycans، حيث تُعد مصائد الحمض النووي بمثابة جهاز مناعي نباتي في منطقة الجذور، وتشابه بذلك الخلايا البلعمية في جسم الإنسان من الناحية التركيبية والوظيفية (Driouich et.al., 2019) عندما تنجذب المسببات المرضية المتواجدة في التوبة إلى مصائد الحمض النووي فإنها تقوم بمُحاصرتها ومن ثم القضاء عليها وكلما زاد تركيزالحامض النووي الخارج خلوي كلما زادت عملية الإصطياد بالتالي يقابلها قلة مقاومة المسبب المرضي (Paungfoo Lonhienne et al., 2010). لذا هدفت الدراسة الى دراسة تأثير بعض الأحياء المجهرية في مصائد الحامض النووي خارج الخلوي exDNA Traps لجذور نبات الخس *Lactuca sativa*.

المواد وطرائق العمل:

تصميم وتنفيذ التجربة Experiment design and implementation:

أُجريت هذه الدراسة في موسم الشتاء لعام 2023-2024 في الظلة الخشبية في كلية العلوم/جامعة القادسية وقد تناولت هذه الدراسة دراسة التأثير والتحري عن مصائد الحامض النووي الخارج خلوي exDNA لجذور نبات الخس مع وبدون إضافة راشح الأحياء المجهرية المُتناول دراستها في الرسالة (*Trichoderma spp., Aspergillus niger*)، تمت الزراعة الأولية للنبات داخل أصص لأجل المراقبة وقد أُختير الصنف المحلي للبذور لغرض إجراء التجربة.

تهيئة التربة Soil preparation:

تم أخذ عينة التربة من العمق 1 إلى 25 سم من تربة أحد الحقول الزراعية لزراعة الخس في قضاء عفك الواقع جنوب شرق محافظة الديوانية والذي يبعد بحوالي 30 كم عن مركز المحافظة، بعد الحصول على عينة التربة تم فحصها في أحد مختبرات محافظة الديوانية لدراسة خصائصها حيث تم تجفيفها ونخلها وتم أخذ العينات ووضعها داخل أكياس بلاستيكية لغرض قياس خصائصها الفيزيائية والكيميائية.

زراعة البذور Planting seeds:

تم إستخدام بذور الخس Lactuca sativa المحلي وتجهيزها للزراعة من قِبل فلاح و زُرعت في 3 أكتوبر 2023 بواقع 5 بذور في كل أصيص حيث تم تجهيز 30 أصيص بزراعة الأولية حاوي على 5 بذور من الخس، زُرعت البذور بعمق 1.5 سم في داخل الأُصص وتم تغطيتها تغطية خفيفة بالتربة وسقيها بالماء ثم مراقبة النمو وبعد مرور 16 يوم على النمو تم تخفيف تزاحم نمو البادرات إلى 2 في كل سندان.

الأوساط الزرعية المُستخدمة Culture Media:

وسط البطاطا دكستروز أكار(:PDA (Agar Dextrose Potato

حُضر الوسط الجاهز حسب توصيات شركة HIMEDIA – India بإذابة 39 غم من مسحوق وسط البطاطا دكستروز أكار في كمية من الماء المقطر وأكمال الحجم للوصول الى لتر واحد، أضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل وسدت فوهاتها بسداد قطني محكم وعقمت بالمؤصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/ إنج لمدة 20 دقيقة بعدها تُرك ليبرد الوسط ثم تم صبه بأطباق بتري وحسب الإستخدام.

وسط مستخلص البطاطا والدكستروز السائل Dextrose Potato Broth (PDA):

حُضرالوسط بغلي 200 غم من قطع البطاطا بعد غسلها وتقطيعها الى قطع صغيرة في 500 مل من الماء المقطر ولمدة 20 – 30 دقيقة على نار متوسطة إلى هادئة وبعد إنتهاء مدة الغليان رُشح المخلوط بواسطة قطعة نظيفة من القماش للحصول على المستخلص ثم أذيب 20 غم من السكر في 500 مل من الماء المقطر ثم أضيف له راشح البطاطا وأُكمل الحجم الى 1 لتر أضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر لمنع نمو البكتيريا ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 من الوسط السائل في كل دورق و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم وعقمت ثم تم إستخدامها حسب التجربة.

المُعلق الفطري:

حُضّر المعلق الفطري بتنمية الفطر أولاً على وسط PD broth في دوارق زجاجية عدد 6 كل 3 دوارق لفطر سعة ml250 وحُفظت الدوارق في درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة 7 أيام مع الرج كُل يومين لغرض توزيع النمو، بعد اليوم السابع تم الترشيح بواسطة ورق ترشيح دقيق وأُخذ 1مل من الراشح ووضع على شريحة عد الأبواغ haemocytometer حيث حصلنا على تركيز 2×10^10 ولغرض الحصول على التركيز طبقنا المعادلة حسب طريقة (Lacey 1997):

كمية (مل) المأخوذة من المُعلق الرئيسي = (المطلوب التركيز)/(الرئيسي المعلق تركيز)

حيث تم إضافة 50 مل بهذه الطريقة لكل من نباتات التجربة، علمًا أنه بعد إتمام الرواشح تم إضافتها للنباتات النامية حديثًا بتاريخ 17 نوفمبر وتم انتظار تغلغل الرواشح مع التربة وإختلاطها بالجذورعن طريق إنتظار 3 عمليات سقي للنباتات لأجل إجراء تجربة مصائد الحامض النووي الخارج خلوي

الفطريات المستخدمة في التجربة Fungi in the experiment:

تم الحصول على عينات فطر Trichoderma spp. وفطر Aspergillus niger من قسم الوقاية لكلية الزراعة في جامعة كربلاء وتم تشخيصهما بالإعتماد على الصفات التصنيفية الواردة في (Kubicek and Harman 2002)

استخلاص الحامض النووي الخارج خلوي exDNA:

أولاً: البادئات (Primers) :

تم تصميم أجهزة PCR الأولية للكشف عن *Lactuca sativa* في هذه الدراسة باستخدام قاعدة بيانات NCBI-Genbank وprimer3 plus عبر الإنترنت، تم توفير هذه البادئات من قبل شركة Macrogen من كوريا على النحو التالي:

جدول (1) البادئات المستعملة في الدراسة

Primer	Sequence (5'-3')		PCR product size	NCBI Reference code
Mitochondrial DNA	F	ATTTCAAGGGGGTGCAACAC	93bp	MZ159953.1
	R	GTGGATTCACGTAGAACATC GC		
chloroplast DNA	F	AAAAGCGTGGTTCGAGTAGC	147bp	AP007232.1
	R	CCTATTCCGTCTATGTCGTAG GG		
Chromosomal DNA	F	AAAGGCAGAATCCGGTTCAG	83bp	NC_056623.2
	R	TTGATTCCCAGCAGCGTTTC		

تم إستخلاص الحمض النووي الجيني لنبات الخس (*Lactuca sativa*) باستخدام "مجموعة استخلاص **G-Spin DNA** مع التعديل" وذلك وفقًا لتعليمات الشركة كما يلي:

جمع العينة:

تُجمع العينات من جذور نبات Lactuca sativa وما حولها من مادة هُلامية (علمًا أنه تم جمع ثلاث عينات من الجذور) لنبات الخس بدون إضافة ونبات الخس بإضافة فطر *trichoderma spp* بإضافة فطر *Aspergillus niger*.

ثانيًا: إستخلاص الحامض النووي:

تم إستخلاص الحامض النووي الخارج خلوي النباتي من Lactuca sativa بإستخدام طقم (كِت) gSYNCTM DNA Extraction kit (Geneaid. USA) مع بعض التعديلات والتي تم إجرائها وفقًا لتعليمات الشركة بالخطوات التالية:

الخطوة الأولى: تحلل الخلايا

1. يتم مُجانسة عينات النبات المُتجمدة مع النيتروجين السائل
2. تم نقل 200mg من العينات التي تمت مُجانستها مع النيتروجين السائل للتعقيم في أنبوبة 1.5 ml microcentrifuge ثم أُضيف 500ml من سائل بفر للتحلل lysis buffer و 20 ميكرولتر من proteinase K ومزجه بواسطة جهاز الفورتكس بعد ذلك تُحضن بدرجة حرارة 60 مئوية لمدة خمس دقائق.
3. بعد ذلك يُضاف 200 ميكرولتر من محلول GSB binding buffer للأنابيب ويتم مزجه بواسطة جهاز الفورتكس vortex ثم تُحضن الأنابيب بدرجة حرارة 60 درجة مئوية على الأقل لمدة 10 دقائق.

الخطوة الثانية: ربط الحامض النووي

1. يتم إضافة 200 ميكرولتر من الإيثانول وتُرج الأنابيب بشكل متجانس لمدة 10 ثوانٍ.
2. يتم نقل المواد المتحللة الناتجة من الخطوة أعلاه بعناية إلى أنبوبة spin column الذي يتم تركيبها بواسطة 2ml بإنبوبة تجميع، ثم تُغلق الأنابيب ويتم طردها مركزيًا بقوة 8000 rpm لمدة دقيقة.

الخطوة الثالثة: الغسل

1. يتم التخلص من المتحلل بالإنبوبة (الراشح) وترك الراسب ثم يُضاف رد 500 ميكرولتر من محلول الغسل (w1 washing buffer 1) يُضاف إلى كُل أنبوبة spin column ومن ثم يتم إستخدام الطرد المركزي لـ 8000rpm لمدة دقيقة.
2. يتم التخلص بعد ذلك من محلول الغسل الأول W1 ويُضاف بعد ذلك 500 ميكرولتر من محلول الغسل الثاني (W2 washing buffer 2) لكُل أنبوبة spin column ومن ثم توضع بجهاز الطرد المركزي لـ 8000rpm ولمدة دقيقة.
3. يتم التخلص بعد ذلك من محلول الغسل الثاني W2 ثم يتم إدخال الأنابيب لجهاز الطرد المركزي مرة أخرى وعلى قوة 12000rpm لمدة دقيقة لأجل التخلص نهائيًا من الإيثانول.

الخطوة الرابعة: الشطف Elution

بعد ذلك، يتم نقل أنبوبة spin column والحاوية على الحامض النووي الخارج خلوي إلى التعقيم بإنبوبة 1.5 ml microcentrifuge ويُضاف لها 100 ميكرولتر من محلول elution buffer وتُترك الأنابيب بشكل مُستقر لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة حتى يتم إمتصاص محلول بفر بشكل كامل في الفلتر (المصفى الزجاجي) لأنبوبة spin column وأخيرًا وبعد إمتصاص المحلول يتم وضع الأنابيب جميعها لجهاز الطرد المركزي بقوة 8000rpm لمدة دقيقة لشطف الحامض النووي ثم تُخزن الأنابيب بدرجة حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر للتجميد.

تقدير إجمالي الحمض النووي المستخلص:

تم التحقق من إجمالي الحمض النووي المستخلص باستخدام جهاز نانودروب (جهاز تحليل الطيف المرئي والمرئي بالأشعة فوق البنفسجية Thermo Scientific NanoDrop Lite، الولايات المتحدة) الذي يقيس تركيز الحمض النووي (نانوغرام/ميكرولتر) ويتحقق من نقاء الحمض النووي في الريبوز (280/260 نانومتر) وفقًا للخطوات التالية:

1. بعد فتح برنامج نانودروب تم اختيار التطبيق المناسب (الأحماض النووية، الحمض النووي).
2. تم أخذ قطعة منديل جاف وتنظيف أكثر من مرة بسطح قواعد القياس، ثم تم استخدام الشفاطة بحرص لنقل 2 ميكرولتر من ماء free nuclease ووضعه على سطح قاعدة القياس السفلى لإعداد النظام.
3. تم خفض ذراع أخذ عينة النانودروب وتم قياس عينة الحمض النووي بحجم 1 ميكرولتر.

تجربة Real-Time PCR:

تم إجراء تجربة Real-Time PCR وفقًا للطريقة والخطوات التالية:

أولاً: Real-Time PCR master mix preparation

تم تحضير المزيج الرئيسي بواسطة (GoTaq® Probe qPCR Master Mix) وتم إتباع الطريقة وفقًا لتعليمات الشركة المُدرجة أدناه: (The standard qPCR master mix for each BK Polyomavirus subtype)

جدول (2) المزيج الرئيسي المستعمل لاجراء تجربة Real-Time PCR

PCR Master mix	Volume
DNA template 5-50ng	5µL
Forward primer (10pmol)	1µL
Reverse primer (10pmol)	1µL
qPCR master mix	10µL
Nuclease free water	3 µL
Total volume	20µL

بعد ذلك تم مزج مكونات qPCR master mix الموجودة في الجدول أعلاه ووضعها في Exispin vortex centrifuge بقوة rpm3000 ولمدة ثلاث دقائق ثم بعد ذلك توضع في جهاز Real-time PCR Thermocycler (BioRad) USA

ظروف جهاز Real-Time PCR Thermocycler:

تم وضع شروط وظروف جهاز Real-Time PCR Thermocycler وفقًا لدرجة حرارة التصلب والوقت الحقيقي التي تستغرقه Real time -PCR kit وحسب تعليمات Biorad Real-Time PCR thermocycler system وفقًا للجدول التالي:

جدول (3) ظروف جهاز Real-Time PCR Thermocycler

Step	**Condition**	**Cycle**
Pre-Denaturation	95 °C 2 min	1
Denaturation	95 °C 15 sec	45
Annealing/Extension	60 °C 30 sec	
Detection (Scan)		

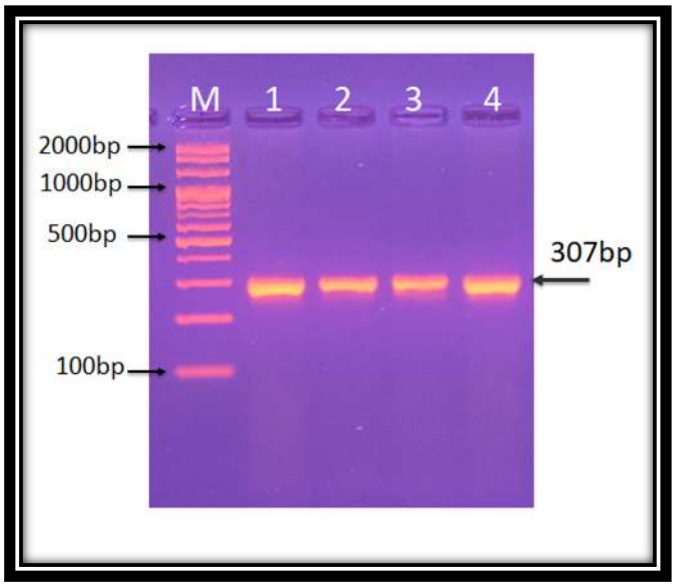
تحليل بيانات Real-Time PCR:

تظهر تحليلات qPCR عن طريق حساب رقم دورة العتبة (قيمة CT) الذي قدّم عينات التضخيم الإيجابية (DNA copy numbers) في Real-Time PCR cycle number.

النتائج والمناقشة

إستخلاص وتنقية الحامض النووي الخارج خلوي:

تم جمع ثلاث عينات من المادة الهلامية حول الجذور للخس بدون وبإضافة الفطريات وبواقع 3 مكررات لكل عينة حيث تم التحري عن وجود الحامض النووي الخارج خلوي بثلاث مواقع لكل عينة تضمنت هذه المواقع (المايتوكوندريا والبلاستيدة والنواة) وقبل الشروع تم قياس نقاوة العينات الثلاثة للمادة الهلامية بطرف الجذر وسُجلت البيانات الواردة في قراءات جهاز النانودروب حيث سجل الخس بإضافة *Trichoderma spp.* أعلى نقاوة حيث بلغت 21.2 (نانوغرام) تليها نسبة النقاوة الخس بلا إضافة *Lactuca stativa* حيث سجلت القراءة للجهاز 18.5 (نانوغرام) وأقل نسبة للنقاوة سجلتها عينة الخس وجود *Aspergillus niger* حيث كانت 9.6 (نانوغرام) كما وبينت النتائج إن أعلى نسبة لمصائد الحامض النووي الخارج خلوي مصدرها من البلاستيدة الخضراء للخس حيث سجل حجم الـ PCR المُنتج لها 147bp ثم يلي البلاستيدة بوجود أعلى حجم للـ PCR المُنتج في المايتوكوندريا حيث بلغ الحجم 93pb بينما أقل حجم كان للنواة (الكروموسومي) حيث سجل الحجم 83bp. بشكل عام حيث يُظهر الشكل (1) أدناه صورة الترحيل الكهربائي PCR للحامض النووي لنبات الخس بنسبة 1.5% أكاروز 70 فولت/سم TBX بفر ولمدة ساعة بحجم 307bp.

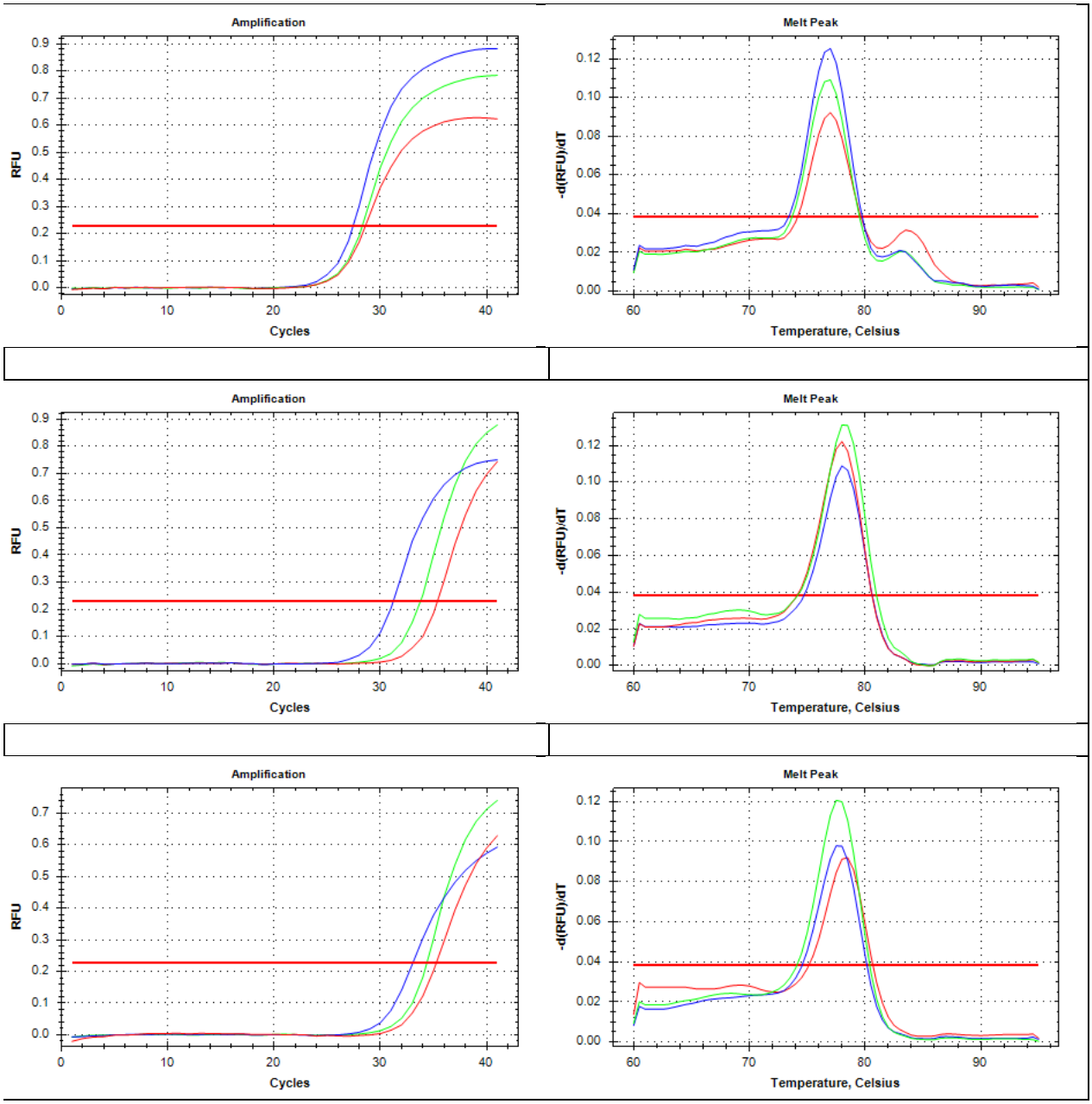


شكل (1) صورة الترحيل الكهربائي PCR للحامض النووي لنبات الخس

تم التحري عن طريق تحديد وتشخيص مصدر الحامض النووي الخارج خلوي وأظهرت جميع العينات الثلاثة على وجود حامض نووي خارج خلوي في النواة والمايتوكوندريا والبلاستيدة ولأن النتيجة واحدة للحامض النووي الخارج خلوي لنبات الخس تم تتبع التغير الذي طرأ على الحامض النووي الخارج خلوي عن طريقة تقنية Real Time PCR DNA copy number لأجل الإستدلال حول كمية الحامض النووي الخارج خلوي في النبات بدون وبوجود الفطريات، ظهرت نتائج التقنية بأعلى قيمة لـ copy number main عند الخس بوجود فطر الأسبرجلس *Aspergillus niger* وهذا يعني قلة الحامض النووي الخارج خلوي فكلما كان معامل التضخيم مرتفع هذا يعني تطلب جهد أكبر لأجل إيضاح وتكبير الحامض النووي الخارج خلوي وحسب الشكل (11) تظهر نتائج الـ Real Time PCR DNA copy number.

جدول (4) تحديد وتشخيص مصدر الحامض النووي الخارج خلوي

Target DNA	Sample	qPCR Cq value	DNA copy number	Mean		
nucleus DNA	C	28.13	**1.06E+08**		**Target**	**Copy number Mean**
	C	28.14	**1.04E+08**	**1.01E+08**	Nucleus-DNA-C	1.01E+08
	C	28.23	**9.21E+07**		Nucleus-DNA-T	1.62E+07
	T	29.59	**1.50E+07**		Nucleus-DNA-A	3.41E+08
	T	29.64	**1.41E+07**	**1.62E+07**	Mitochondria-DNA-C	7.97E+04
	T	29.39	**1.95E+07**		Mitochondria-DNA-T	1.05E+04
	A	27.25	**3.60E+08**		Mitochondria-DNA-A	1.77E+06
	A	27.33	**3.22E+08**	**3.41E+08**	Chloroplast-DNA-C	4.39E+04
	A	27.29	**3.40E+08**		Chloroplast-DNA-T	8.49E+03
mitochondiral DNA	C	33.72	**9.70E+04**		Chloroplast-DNA-A	1.82E+05
	C	33.46	**1.31E+05**	**7.97E+04**		
	C	35.65	**1.13E+04**			
	T	35.36	**1.55E+04**			
	T	35.56	**1.25E+04**	**1.05E+04**		
	T	36.76	**3.47E+03**			
	A	31.56	**1.25E+06**			
	A	31.2	**1.94E+06**	**1.77E+06**		
	A	31.13	**2.12E+06**			
Chorosplast DNA	C	34.54	**3.84E+04**			
	C	34.35	**4.75E+04**	**4.39E+04**		
	C	34.38	**4.59E+04**			
	T	36.26	**5.89E+03**			
	T	36.27	**5.82E+03**	**8.49E+03**		
	T	35.47	**1.38E+04**			
	A	33.23	**1.71E+05**			
	A	33.07	**2.06E+05**	**1.82E+05**		
	A	33.23	**1.71E+05**			



يوضح الشكل (2) المنحنى للتضخيم لتقنية Real-Time PCR(اللون الأحمر يُمثل الخس من دون إضافة، اللون الأخضر الخس بإضافة *Trichoderma*، اللون الأزرق الخس بإضافة *A. niger*)

نتائج التحري عن المصائد الحامض النووي الخارج خلوي لجذور الخس بدون إضافة وبوجود الفطريات في الدراسة:

تتمثل المادة الوراثية في النباتات بالحامض النووي الرايبي منقوص الأوكسجين DNA حيث يتواجد داخل الخلية وبمواقع مختلفة حيث لا يقتصر على النواة في مركز الخلية بداخل الكروموسومات إنما يتواجد في الميتوكوندريا وكذلك داخل البلاستيدات، يحدث وأن يخرج هذا الحامض النووي خارج الخلايا عن طريق إضمحلال الغلاف النووي أثناء عملية الإنقسام الخلوي أو من خلال النقل النشط الذي يحدث في الخلايا عندها يُسمى بالحامض النووي الخارج خلوي (Bai, 2017).

كشفت نتائج الدراسة بكثافة وجود مصائد الحامض النووي خارج الخلوي المُفرز من البلاستيدة لخلايا الجذر الحدودية والنسبة الأعلى يُمكن أن تُعزى إلى كثرة تواجد البلاستيدات الخضراء داخل النبات وكذلك كثرة تواجد الحامض النووي البلاستيدي كما ذكر (Talcott and Moore 1999) واصفًا إيها بأنه خفيف الوزن الجزيئي حيث كلما قل الوزن الجزيئي

زادت فرصة حمله عبر عملية النقل النشط كما ويحتوي على 200 جين تقريبًا، كذلك مصائد الحامض النووي المايتوكندري صغير الوزن الجزيئي لذا حل بالمركز الثاني بكثافة وجود مصائد الحامض النووي الخارج خلوي للخلايا الحدودية للجذر بالإضافة إلى قدرة الحامض المايتوكندري على الإستنساخ السريع خلال 5 ساعات مكنته هذه المزيّة من التواجد الكبير وكما ذكر (Nunnari, 2012) إذ يحتوي هذا النوع على ما يقارب 5000 حامض أميني.

حلت مصائد الحامض النووي الخارج خلوي الكروموسومية بأقل نسبة بين الثلاث يعود السبب للوزن الجزيئي الكبير جدًا لهذا النوع حيث يصعب نقل الحامض النووي خارج الخلية عن طريق عملية النقل النشط (Lukacs, 2000) تلعب الخلايا الحدودية دورًا مهمًا بعملية بعملية إفرازات الخلايا الجذرية والمصائد الخارج خلوية، تقع هذه الخلاي بموقع طرفي في الجذر وتُعرف بالخلايا النشطة أيضيًا في طرف الجذر محمية بالقلنسوة الجذرية (Hawas, 2003) والمادة الهلامية المحيطة بالجذر ما هي إلا شبكة ليفية دقيقة حاوية بداخلها على الحامض النووي الخارج خلوي المرتبط بالهستون المُفرز من الخلايا الحدودية وتُعرف هذه المادة الهلامية بإسم المصائد الخارج خلوية والتي تتمثل بالقيام بوظيفة مناعية متمثلة بحماية النبات من الأمراض وإنتقال العدوى، تم أختبار العينات تحت نظام Real-Time PCR وذلك لكون العينات الثلاث جميعها تنتمي لنبات واحد بغض النظر عن إضافة الفطريات فالحامض النووي هو ذاته للخس لا تطرأ طفرات أو تغايرات جذرية بين عينة وأخرى، ولأن تقنية Real- Time PCR هي عملية تجمع بين الكشف والتضخيم للحامض النووي ولذلك تُستخدم بشكل كبير في مجال قياس تعبير الجينات (Higuchi et al., 1993) فالتعبير الجيني يكون أقوى كلما كان متوسط التضخيم أقل وهذا ما حدث مع فطر الترايكوديرما *Trichoderma spp*.

الاستنتاجات:

نستنتج من الدراسة ان التلقيح بفطر *Trichoderma spp* ادى إلى زيادة الكتلة الحيوية الكلية للنبات وبالتالي أثرت كمية النواضح على أيض النبات وجودته بوجود المواد الكيميائية الفعالة التي تمنحه القدرة على مقاومة مسببات الأمراض. تساهم المعرفة بقدرات *Trichoderma spp* المكتسبة في السنوات الأخيرة في النظر لإنشاء تقنيات معالجة نباتية جديدة وذلك لإستحثاثها مقاومة مجموعة متنوعة من المواد الكيميائية السامة وكذلك حاجز تحفيز لمناعة النبات في ظل بيئة حاوية على مختلف مسببات الأمراض كبيئة الجذر. ولأن فطر *Trichoderma spp*. له تأثير جيد على تثبيط مسببات الأمراض وتعزيز نمو النبات وكذلك تحفيز المقاومة النباتية وإرتفاع مغذيات التربة هذا يدل على إمكانية استخدامه لمزيد من التطبيقات في الزراعة

References

Tran T. M., Macintyre, A., Hawes, M., & Allen, C. (2016). Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium Ralstonia solanacearum. PLOS pathogens, 12(6).

Pepe G, Sommella E, Manfra M, De Nisco M, Tenore GC, Scopa A, Campiglia P. (2015). Evaluation of antiinflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (Lactuca sativa L.; var. Maravilla de Verano). Food Chemistry 167:153-161.

Romani A, Pinelli P, Galardi C, Sani G, Cimato A, Heimler D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. Food Chemistry 79(3):337-342.

Liorach R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Ferreres F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. Food Chemistry 108(3):1028-1038.

Anand S. and J Reddy. (2009). Biocontrol potential of Trichoderma sp. against plant pathogens, International Journal of Agriculture Sciences, 1, 2 pp. 30-39.

Siemering, M. Ruark, A. Geven. (2016). The Value of Trichoderma for Crop Production.University of Wisconsin--Extension, Cooperative Extension

Bhat K. A. (2017). A new agar plate assisted slide culture technique to study mycoparasitism of Trichoderma sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*. Int. J. Cur. Microbiol. Appl. Sci. pp. 3176-3180.

Kumar R, Kumari K, Hembram KC, Kandha L, Bindhani BK. (2019). Expression of an endo α-1, 3-Glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in rice induces resistance against sheath blight. J Plant Biochem Biotechnol 28:84–90.

Driouich, A., Smith, C., Ropitaux, M., Chambard, M. Boulogne, I., Bernard, S., Follet-Gueye, M.-L., Vicré, M. and Moore, J. (2019). Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence. Biol Rev 94: 1685-1700.

Kumar R, Kumari K, Hembram KC, Kandha L, Bindhani BK. (2019). Expression of an endo α-1, 3-Glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in rice induces resistance against sheath blight. J Plant Biochem Biotechnol 28:84–90.

Rao CV and Rajasab AH. (1992). Investigations on black mold (*Aspergillus niger*) of onion. Onion Newslett Trop 4: 66-67.

Larkin R P and Fravel DR. (2002). Effects of varying environmental condition on biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium sp.* Phytopathology 92: 1160-1166.

Motte H, Vanneste S, Beeckman T. (2019). Molecular and environmental regulation of root development. Annu Rev Plant Biol 70:465–488.

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. (2014) Abiotic and biotic stress combinations. New Phytol 203:32–43.

Ganesh A, Shukla V, Mohapatra A, George AP, Bhukya DPN, Das KK, Kola VSR, Suresh A, Ramireddy E. (2022). Root cap to soil interface: a driving force toward plant adaptation and development. Plant Cell Physiol 63:1038–1051.

Atkinson NJ, Urwin PE. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J Exp Bot 63:3523–3543.

Hawes MC, Lin HJ. (1990). Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). Plant Physiol 94:1855–1859.

Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G. (2003). Root caps and rhizosphere. J Plant Growth Regul 21:352–367.

Hawes MC, Pueppke SG. (1986). Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells. Am J Bot 73:1466–1473.

Paungfoo-Lonhienne, C.; Rentsch, D.; Robatzrk, S.; Webb, R.I.; Sagulenko, E.; Nasholm, T.; Schmidt, S.; Lonhienne, T.G.A. (2010). Turning the table: Plantse11915 consume microbes as a source of nutrients. PLoS ONE, 5, e11915.

Badri DV, Vivanco JM. (2009). Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environ 32:666–681.

Watson. R. (1993). Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY) 11:1026-1030.

Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. Cell, 148(6), 1145-1159.

Talcott B., and MOORE, M.S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. Trends Cell Biol. 9, 312-318.

Bai, H., Lester, G. M. S., Petishnok, L. C., & Dean, D. A. (2017). Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. Bioscience reports, 37(6).

Suleiman A., Mahdieh R., Mohammad M., Fereshteh S., Abolfazl A. (2018). Essential Oil Constituents of Seeds and Fresh Leaves of Garden Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Grown in Isfahan, Iran. RJP Volume 5, Issue 3 July 2018, pp 1-5.

Parkell, N.B., Hochmuth, R. C. and Laughin, W. L. (2015). An Overview of lettuce production systems and Cultivars Used in Hydroponics and protected culture in Florida. Horticultural science department HS1258, University Florida Extension. P6

Hütsch, BW.; Augustin, J.; Merbach, W. (2002). Plant rhizodeposition – an important source for carbon turnover in soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 165 (4): 397–407.

Gregory P. J. (2008). Plant Roots: Growth, Activity and Interactions with the Soil. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons

Jan AT, Azam M, Ali A, Haq Q. (2011). Novel approaches of beneficial pseudomonas in migration of plant diseases- an appraisal. Journal of plant interaction 6:195-205

Van Baarlenp, Van Belkum A, Summerbell RC, Crous PW, Bart P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop Cross-kingdom host jumps? FEMs Microbiology Reviews 3:239-227.

Domenico R., Leonardo S., Chiara S. (2019). Effects of solid and liquid digestate for hydroponic baby leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation. 244:172-181, DOI: 10.1016/j.scienta.2018.09.037

Kim MJ, Moon Y, Tou JC, Mou B, Waterland NL. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Food Composition and Analysis 49:19-34.

Van Wees, S. C. M., van der Ent, S. & Pieterse, C. M. J. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Curr Opin Plant Biol 11, 443–448.

Vargas, W. A., Mandawe, J. C. & Kenerley, C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. Plant Physiol 151, 792–808.

Viterbo, A. & Chet, I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. Mol Plant Pathol 7, 249–258.

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization. Plant Physiol 147, 779–789.