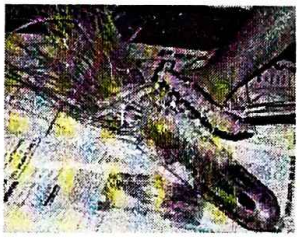
عزل سبورات فطريات (VAM) من التربة :-

تجرى 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 :-

١-يؤخذ تربة وزن 100 غرام تربة ووضعت في بيكر يحتوي 500 مل ماء مقطر وترج جيدا وتترك لمدة 15 – 20 دقيقة ويفضل استخدام الخلاط لتفيتت تجمعات التربة .

Extraction of Spores

The procedure detailed here focuses on extraction of spores from greenhouse-grown pot cultures (cone-tainers, deepots, pots). In all of the various pot types, a pie-shaped slice is removed from the side that extends almost to the center and from top to close to the bottom. In all cases (including field soils), it is critical that a representative sampling of roots is included in the sample because some species in all genera except Gigaspora produce intraradical spores.



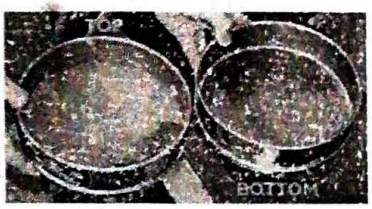
The sample is placed in water in a Waring Blender and blended at high speed for approximately five seconds. The purpose of this step is to break up root fragments and release spores and also to release spores from hyphal aggregates attached to roots or in the soil (especially those of species with robust thick-walled hyphae). Longer blending times do not affect spores, but can break up roots to the extent that more organic detritus is associated with spores in the extracted spore prep.

٢-يمرر العالق عبر مجموعة من المناخل 38 – 45 – ٧٥ – ١٠٦- ١٢٥ – 180 – 250– ٥٠٠- مايكرون .

ان المناخل المهمة التي تكون ذات قياس ٣٨ و ٤٥ و ٧٥ و ١٠٦ مايكرون ، لان اغلب سبورات فطريات المايكوريزا تقع ضمن هذا المدى من قياس فتحات المناخل وتهمل القياسات الكبيرة ٥٠٠ و ٢٥٠ وذلك لانها تحتوي على كمية كبيرة من قطع الجذور والرمل والمواد العضوية الاخرى ، بعد تكرار تمرير الماء خلالها للتاكد من نزول السبورات العالقة فيها وتمرر في المناخل ذات الفتحات الصغيرة .

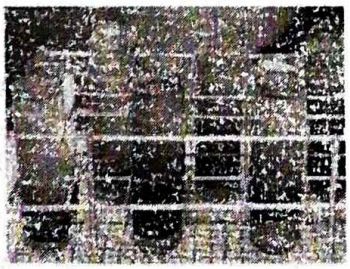
The blended material is immediately poured through two sieves. Most sand remains in the blender.

The bottom sieve has openings of 38, 45, or 53 µm (any of these three work well for most species, although there are some small hyaline glomoid species that require the 38 µm sieve). It captures the majority of spores.



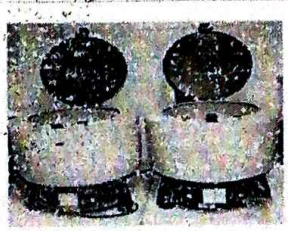
The top sieve generally has 500 µm openings. It captures roots, debris, and large spores. Despite the amount of organic material, spores are large enough to be easily detected and collected.

٣-تغسل المناخل ٣٨ و ٤٥ و ٧٥ و ١٠٦ و ١٢٥ مايكرون جيدا ويجمع ما تبقى على سطح كل منخل ويوضع في انبوبة اختبار ويكتب عليها رقم المنخل .



٤-توضع انابيب الاختبار في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥-١٠ دقائق يسكب الراشح ويؤخذ الجزء المترسب اسفل انبوبة الاختبار.

Generally, we do not process material in the top sieve through a centrifugation step because of the amount of organic detritus. It is washed, transferred to a large petri dish, and viewed through a stereomicroscope just to verify that no spores are present. The material on the bottom sieve is collected in a 50-mL beaker and then transferred into 50-mL tubes containing a 20/60% gradient. These tubes are centrifuged (approx. 960 x g) for 2-3 minutes in a swinging-bucket rotor in a tabletop centrifuge. At the end of the run, soil and other sense particulates are pelleted in the bottom of the tube. Spores and fine organic detritus is suspended in sucrose (now somewhat blended).



٥-يضاف محلول السكروز ٥٠% (يجب عدم استخدام تركيز اعلى من السكروز وذلك لتلافي التاثير الضار للضغط الازموزي للسكروز على السبورات مما يؤدي الى كسرها وتقليل فعاليتها) يتم رج الانبوبة باليد .

٦-توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق وبعدها يطرح الجزء الصلب في اسفل الانبوبة لعدم الافادة منه ويؤخذ المعلق ويرشح على ورقة ترشيح مع اضافة الماء المقطر لغسل السبورات وبذلك يصبح النموذج جاهزا للفحص المجهري (تفحص بالمجهر التشريحي لمعرفة عدد السبورات و يستخدم المجهر الضوئي للتعرف على سمك جدار السبور وقطر السبور).