جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى / كلية الزراعة

قسم البستنة وهندسة الحدائق

الدراسة الجزيئية ودور الثيادوزورون والبورون والتربتوفان في بعض صفات النمو والحاصل الكمية والنوعية والخزنية للمشمش صنف عموشة

اطروحة تقدمت بها

لمى بشير حسين العباسي

الى مجلس كلية الزراعة / جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية / البستنة وهندسة الحدائق (فاكهة وخضر)

بإشراف

أ.د. علي محمد عبد الحياني

أ.د. غالب ناصر حسين الشمري

1446 هـ

2024 م

التجربة الجزيئية

1-المقدمة

ينتمي المشمش الى فصيلة prunoideae التابعة للعائلة الوردية وانتشر المشمش في جميع أنحاء العالم عبر ثلاثة طرائق انتشار: شرق آسيا إلى اليابان، ومنطقة القوقاز الإيرانية، وأوروبا القارية (Bourguiba واخرون، 2020) ومن المنطقة الإيرانية القوقازية وصلت إلى بلدان البحر الأبيض المتوسط عبر طريقين ثانويين، جنوب أوروبا وشمال أفريقيا، مما أدى إلى نشوء ثلاث مجموعات رئيسة للمشمش في جميع أنحاء حوض البحر الأبيض المتوسط: "القوقاز الإيراني"، و"حوض شمال البحر الأبيض المتوسط". و"حوض جنوب البحر الأبيض المتوسط" (Bourguiba واخرون، 2012)، نشأت جميع أصناف المشمش المزروعة في العالم من نوع واحد فقط هو *Prunus armeniaca L.* (Hormaza واخرون، 2007)،

يعتمد اكثار النباتات على موارد الأصول الوراثية واسعة النطاق إذ أحدث علم الجينيوم ثورة في طرائق التربية، وهناك العديد من التقنيات التي يجري تطويرها وتحسينها لتربية النباتات والتي تنعكس على النمط الظاهري فضلا عن دراسة العلاقة بين النمط الظاهري والنمط الوراثي (Geuna واخرون، 2024)، مع زيادة عدد الأصناف يصبح التمييز بينها على أساس المؤشرات المظهرية اكثر صعوبة اذ تتأثر بالعديد من العوامل مثل نوعية الثمار والامراض التي تصيب الثمار والأوراق فضلا عن تأثرها بالعوامل البيئية وعوامل خدمة البساتين مما يجعل هذه العوامل غير دقيقة مما دعى الباحثين الى إيجاد مؤشرات اكثر دقة وكفاءة في التصنيف، لذا كانت الحاجة الى اتباع طرائق جديدة كإجراء البصمة الوراثية للنباتات، فأنتقلت البحوث في الآونة الأخيرة لاعتماده أداة قوية لا تتأثر بالظروف التي تتأثر بها المؤشرات المظهرية وفيها نسبة ثبات عالية (Jaccoud واخرون، 2001)

هدفت هذه الدراسة الى انشاء مجمع وراثي للاصناف المزروعة في محافظة ديالى بغية الحفاظ عليها وتثبيت البصمة الوراثية لها وتحديد القرابة الوراثية بين الأصناف شركة، وزاغينيا، قيسي وعموشة باستعمال تقانة DNA-Sequence Markers.

2 – مراجعة المصادر

2-1: تفاعل PCR (Polymerase Chain Reaction)

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR هو احد التقنيات العلمية في البيولوجيا الجزيئية لتضخيم نسخة واحدة او بضع نسخ من قطعة من الحمض النووي خارج الجسم الحي مما ينتج الاف الى ملايين النسخ من تسلسل DNA معين، اذ تسمح هذه التقنية بتضخيم كمية صغيرة من DNA عدة مرات بطريقة أُسية مع توفير المزيد من مكونات DNA، كما تعد تقنية شائعة تستخدم في مختبرات البحوث الطبية والبيولوجية لمجموعة متنوعة من التطبيقات مثل الكشف عن الامراض الوراثية وتحديد البصمات الوراثية، استنساخ الجينات وحساب الحمض النووي (Baretlett و Stirling، 2003 ، Rahman واخرون، 2013)

2-2: مؤشرات تتابع شريط DNA (DNA Sequence Marker)

تلعب التتابعات النيوكليوتيدية لشريط DNA دوراً مهماً في تحديد هوية النبات ودرجة القرابة الوراثية له، وهي احدى الطرائق التحليلية السريعة والموثوقة في تحديد جينيوم النبات والتي تعتمد على تقنية PCR، وهي تمثل تسلسلاً لمنطقة معينة من الجينيوم مثل منطقة ITS1 و ITS2 (Internal Transcribed Spacer) 5.8s و18s و25s الموجودة على احد الكرموسومات او عدد منها والتي توجد على مناطق معينة من rRna تكون غير مشفرة ولكن لها دور في ترجمة البروتينات وبنائها (Gillespie واخرون، 2006)، وقد أجريت دراسات عديدة لأنواع نباتية مختلفة، اذ نفذت دراسة جزيئية من قبل المياحي (2018) على أشجار الرمان *Punica granatum*، جرى فيها تحديد البصمة الوراثية وتمييز 10 طرز الرمان المحلي، وجمعت من 7 مواقع تمثل اهم مناطق زراعة وإنتاج الرمان في العراق، استعملت تقانة ISSR لتحديد العلاقات الوراثية بين طرز

الرمان المدروسة (10 طرز) باستعمال 10 بادئة، وقد تراوحت درجة التشابه بين هذه الطرز من 64–97%، وامكن تقسيم الطرز المدروسة الى مجموعات وفق درجة القرابة الوراثية. ومنها ما قام به Sevindik و Murthan (2023) بدراسة على سبعة أنماط وراثية من الكمثرى (*P. communis*) باستخدام الجين DNA rbcL وأُنشِئت الشجرة الوراثية لتحديد العلاقات بين الأنماط الجينية لهذا الجنس وتراوحت متواليات cpDNA rbcL المضخمة بين 546 و551 نيوكليوتيدة. كما اجرت Abdulrahman واخرون (2023) تحليلا وراثيا لجنس *prunus* باستخدام مؤشرات جينية كتوصيف بايولوجي عضوي كيميائي لتحديد التنوع الجيني لانواع مختلفة من هذا الجنس في العراق بالاعتماد على مؤشرات جزيئية DNA ومؤشرات البلاستيدات الخضراء وجمع 12 نوعا من اللوز (*P. amygdalus*) واختبرت 10 علامات مناطق جينية على كل من DNA و DNA البلاستيدات الخضراء باستخدام PCR مع 10 بادئات منطقة الجينات وتحليل التتابع ل matK وان أسماء منطقة الجينات المستخدمة هي ITS (منطقة ترميز 5.8s + ITS2 + ITS1) ، rb116، matK، rbcL، pbSM+trnD، trnk–rps16، rp136–infArps8، atpB–rbcL ، trnL–trnF، psbA–trnH ونتيجة لذلك تم الحصول على خمسة أشجار مختلفة من النشوء والتطور من التسلسل الجيني للعينات.

3- المواد وطرائق العمل:

3-1: جمع العينات النباتية

جمعت العينات النباتية من الأصناف (زاغينيا، شركة (أبو الزنجيل)، عموشة والقيسي) اذ كانت الأصناف زاغينيا، شركة (أبو الزنجيل)، عموشة مزروعة في منطقة الكصيرين وصنف القيسي مزروع في منطقة دلي عباس التابعتين لقضاء الخالص/ محافظة ديالى، اخذت نموات ورقية حديثة من كل نبات ثم نظفت وغسلت بالماء المقطر وعقمت بالكحول 70% وحفظت في المجمدة عند درجة حرارة $^{-}85$ مْ لحين استخدامها لاستخلاص DNA.

*اجري العمل المختبري في مختبرات شركة وهج الدنا في محافظة بغداد.

جدول 1: المحاليل المستخدمة لاستخلاص DNA

ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™ (Kit Size)	D6020 (50 preps.)	Storage Temperature
ZR BashingBead™ Lysis Tubes	50	Room Temp.
Lysis Solution	40 ml	Room Temp.
Plant/Seed DNA Binding Buffer*	100 ml	Room Temp.
DNA Pre-Wash Buffer**	15 ml	Room Temp.
Plant/Seed DNA Wash Buffer	50 ml	Room Temp.
DNA Elution Buffer	10 ml	Room Temp.
Zymo-Spin™ IV Spin Filters (Orange Tops)	50	Room Temp.
Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters (Green Tops)	50	Room Temp.
Zymo-Spin™ IIC Columns	50	Room Temp.
Collection Tubes	200	Room Temp.
Instruction Manual	1	-

3-2: استخلاص DNA

استخلصت المادة الوراثية (DNA) من العينات قيد الدراسة وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Vogelstein واخرون (1979) مع اجراء بعض التعديلات الطفيفة عليها وكما موضح بالخطوات الآتية :

1- اضيف 150 ملغم من عينة الاجزاء النباتية الى انبوب تحليل ZR Bashing Bead™ واضيف 750 مايكرولتر من محلول التحليل الى الانبوب.

2- وضع الانبوب في جهاز دوران بمجموعة حامل انبوب سعة 2 مل

3- اجريت عملية الطرد المركزي لأنبوب التحلل ZR Bashing Bead™ بجهاز طرد مركزي دقيق microcentrifuge بقوة 10000 دورة لمدة دقيقة.

4- نقل 400 مايكرولتر من المادة الطافية الى مرشح الدوران Zymo-spin™ IV (الجزء العلوي برتقالي) في انبوب التجميع وعمل طرد مركزي عند 7000 دورة في الدقيقة.

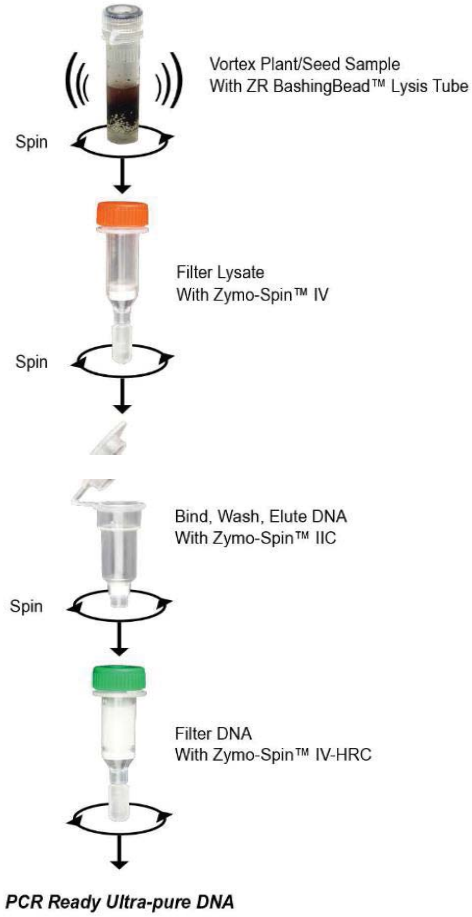
5- اضيف 1200 مايكرولتر من منظم حزم DNA (DNA Binding Buffer) الى المرشح الموجود في في انبوب التجميع من الخطوة الرابعة وخلطه.

6- نقل 800 مايكرولتر من الخليط الناتج في الخطوة 5 الى عمود Zymo-spin™ IIC في انبوب تجميع وعمل طرد مركزي عند 10000 X غم لمدة دقيقة.

7- اهملت المادة الطافية من خلال انبوب التجميع وتكرر الخطوة السادسة.

8- اضيف 200 مايكرولتر من منظم DNA pre-wash الى عمود الى Zymo-spin™ IIC في انبوب تجميع جديد وعمل طرد مركزي عند 10000 x غم لمدة دقيقة واحدة.

9- اضيف 500 مايكرولتر من محلول غسل الى عمود Zymo-spin™ IIC وعمل طرد مركزي عند 10000 x غم لمدة دقيقة واحدة.



شكل3: يوضح خطوات استخلاص DNA

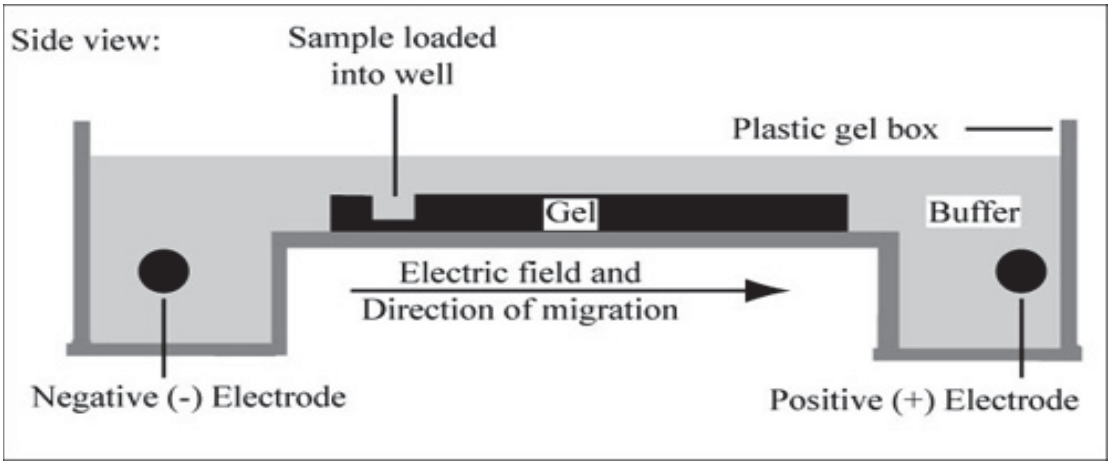
10- نقل عمود Zymo-spin™ IIC الى انبوب طرد مركزي دقيق 1.5 مل ثم يتم اضافة 50 – 100 مايكرولتر من محلول شطف DNA العازلة مباشرة الى انبوب الحشوة وعمل طرد مركزي عند 10000 x غم لمدة 30 ثانية لاستخراج DNA.

11- نقل DNA المعزول من الخطوة 10 الى مرشح Zymo-spin™ IV- HRC spin (القمة خضراء) في انبوب طرد مركزي نظيف سعة 1.5 مل وعمل طرد مركزي له بدقة 800 x

غم لمدة دقيقة واحدة، وعندها اصبح DNA المرشح جاهزا لتطبيقات PCR والتطبيقات الاخرى.

3-3: الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (AGE) Agarose Gel Electrophoresis

حضر هلام الاكاروز وفقا للطريقة المتبعة من قبل Sambrook وآخرون (1989) بتكثيف 1.5% عن طريق اذابة 1.5 غم من الاكاروز في 100 مل من محلول TBE المحضر مسبقا، اذ سخن الاكاروز حتى الغليان ثم ترك ليبرد عند درجة 45-50 م°، سكب الهلام (الجل) في لوحة الصب لتحضير لوحة دعم الاكاروز بعد تثبيت المشط لعمل ثقوب من شانها ان تحمل العينات، سكب الهلام برفق (لعدم السماح بتكوين فقاعات هوائية) وترك لمدة 30 دقيقة كي يبرد، وازيل المشط بلطف من الاكاروز الصلب، وثبتت اللوحة على حاملها في قسم الترحيل الكهربائي افقيا متمثلة بخزان الترحيل الكهربائي المستخدم، اذ ان الخزان ممتلئ بمحلول TBE الذي يغطي سطح الهلام.



شكل 4 : نظام عمل الترحيل الكهربائي

Summary

The study was carried out in three separate molecular, field, and storage experiments.

Molecular experiment:

It was conducted on four local apricot varieties (Zaghinia, Sherkah, Amousha, and Al-Qaisi) during the 2022 growing season, as the varieties Zaghinia, Sherkah, and Amousha were planted in the Al-Qusayrin area and the Al-Qaisi variety was planted in the Dali Abbas area affiliated to Al-Khalis District/Diyala Governorate, to determine the genetic divergence between the four varieties using DNA-Sequence Markers technology. The most important results can be summarized as follows:

- The use of DNA-sequence markers technology revealed genetic variation between varieties, as the highest value of genetic dimension was between the Ammousha variety and the Zaghinia variety, reaching 0.212, while the lowest value was between the Zaghinia variety and the Company variety, reaching 0.155. The similarity percentage between the Company and Zaghinia varieties was 97%, and between the Qaisi and Ammousha varieties was 91%.

Field experience:

- The experiment was carried out in one of the private orchards in the Al-Qaserin area/Diyala Governorate during the 2021/2022 growing seasons on the Amousha variety, with the aim of demonstrating the effect of spraying with thidiazuron at a concentration of 20 mg L^{-1} and boron at a concentration of 100 mg L^{-1} and the interaction between them and tryptophan at three

concentrations: zero, 50, and 100 mg L^{-1}. The most important results can be summarized as follows:

- The spraying treatments with Thidiazuron at a concentration of 20 mg L^{-1} + Boron at a concentration of 100 mg L^{-1} were superior in terms of leaf area, dry matter percentage in leaves, total chlorophyll, carbohydrate content of leaves and branches, N, P, K and B content of leaves, fruit set percentage, reduction in fruit drop percentage, total tree yield, fruit weight (first season only), number of fruits, average length and diameter of fruit, flesh weight (first season only), fruit size, total soluble solids percentage, vitamin C, fruit protein content, carotene pigment content in fruit peel, juice content of total phenols, as well as reducing juice content of total acidity for both seasons.
- The treatment of spraying with the amino acid tryptophan at a concentration of 100 mg L^{-1} was superior in terms of leaf area, dry matter, carbohydrate content of leaves and branches, total tree yield, number of fruits, fruit length, fruit size, percentage of total soluble solids, and fruit content of vitamin C and protein for both seasons, while the treatment of spraying with the amino acid tryptophan at a concentration of 50 mg L^{-1} was superior in fruit firmness (second season).
- The interaction treatment between spraying with Thidiazuron at a concentration of 20 mg L^{-1} + Boron at a concentration of 100 mg L^{-1} gave the highest values of leaf area, total chlorophyll, carbohydrate content in leaves and branches, leaf content of phosphorus and boron, fruit set percentage, and reduced fruit drop (first season only), total sugars, vitamin C, fruit protein content, carotene pigment content in fruit peel, and juice content of total phenols, while the interaction treatment with Thidiazuron at a concentration of 20 mg L^{-1} and Boron at a concentration of 100 mg L^{-1} increased the percentage of dry matter in leaves and the nitrogen content of

leaves and reduced fruit drop (second season only) and fruit size. The interaction between thidiazuron at a concentration of 20 mg L^{-1} and tryptophan at a concentration of 100 mg L^{-1} led to an increase in the potassium content of the leaves and the acidity of the fruit juice.

Storage experiment:

A factorial experiment was designed using a completely randomized design (C.R.D.) on apricot fruits, Amousha variety, with three replicates in one of the private cold stores in Diyala Governorate during the 2022 season, where the fruits taken from the two best treatments of the field experiment were stored as the first factor. The fruits were immersed before storage with calcium chloride at a concentration of 5% and potassium silicate at a concentration of 2 ml L^{-1}, in addition to the non-immersion treatment (comparison) as the second factor. After that, the fruits were packed in plastic containers, and all treatments were stored at a temperature of 0 + 0.5 C and relative humidity (85 - 90%). The fruits were stored for 30 days, after which measurements were taken for the studied traits. The results were analyzed using the SAS program, and the differences between the averages were compared according to Duncan's multiple range test at a probability level of 0.05. The most important results can be summarized as follows:

- The spraying treatment with Thidiazuron + Boron + Tryptophan reduced the percentage of weight loss and spoilage after 30 days of cold storage and gave the highest percentage of total soluble solids, carotene pigment content in the fruit peel, total sugars, and the highest respiration rate and vital heat.
- The calcium chloride immersion treatment outperformed with the lowest percentage of total spoilage, the highest content of vitamin C, and the lowest rate of respiration rate and vital heat, while the potassium silicate immersion treatments gave the lowest percentage of weight loss and total fruit spoilage

and the highest percentage of total soluble solids, total protein, carotene, and vitamin C content of the fruit peel, total sugars, and fruit quality.

- The interaction between the spraying treatment with Thidiazuron + Boron + Tryptophan and immersion in calcium chloride was superior in giving the lowest percentage of total damage and the highest content of protein and vitamin C and reduced the rate of respiration and vital temperature, while the interaction between Thidiazuron + Boron + Tryptophan and immersion in potassium silicate gave the lowest percentage of weight loss and the highest percentage of total soluble solids and the highest content of protein, vitamin C, and total sugars and the highest quality of fruits.