جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامـعة ديـــالى
كلية الــزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق

تحديد التباين الجزيئي لثلاثة أَصناف من التفاح المحلي واستجابتها للرَّش بالباكلوبيوترازول والتربتوفان

أطروحة مقدمة

الى مجلس كلية الزراعة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية / بستنة فاكهة وخضر

تقدم بها

عدي محمد عبدالله

بإشراف

أ.د. علي محمد عبد الحياني

ا.م.د نزار سليمان علي

1447 هـ

2026 م

الملخص

نـُــفِّذت هذه الدراسة علـــى أَشجار تفاح بعمر4 سنوات تعود لثلاثة أَصناف محلية الـــشرابي والابيض (الكاغدي) والابراهيمي وذلك من خلال تجربتين الاولى جزيئية والثانية حقلية هـــدفت التجربة الاولى الى تحديد التباين الوراثي على المستوى الجزيئي للأصناف الثلاثة وتثبيت البصمة الوراثية لها باستخدام تقنية DNA Sequencing حيث اخذت عينة مـــن النموات الحديثة للأوراق لكل صنف مدروس واجريت عملية استخلاص DNA وتضخيم الدنا في مختبر وهج الدنا فـــــي بغداد وحللت نتائج التوصيف الجزيئي بالبرنامج الاحصائي NTSY واظهرت النتائج مايلي :

- أن استخدام تقنية (DNA Sequencing) كانت فعالة في كشف التنوع الوراثي وتثبيت البصمة الوراثية لأصناف التفاح .
- أن الاصناف المدروسة تختلف في تركيبها الوراثي وان الصنفين الشرابي والابراهيمي اكثر قرابة وراثية فيما بينهم وهم الابعد عن الصنف الابيض الذي كان اقرب وراثيا لمعظم الاصناف العالمية المسجلة .
- تبين الدراسة ان الاصناف المحلية قيـــد الدراسة لم يتم تسجيلها فـــــي البنك الجيني العالمي لذا تم تسجيل الاصناف المحلية قيد الدراسة في البنك الجيني للمركز الوطني للمعلومات التقانة الحياتية (NCBI) وحـملت التسلسلات PQ334650 للصنف الشرابي والتسلسل PQ334643.1 للصنف الابيض والتسلسل PQ334622.1 للصنف الابراهيمي، كأول تسجيل في العراق .

التجربة الثانية حقلية وأُجــريت فـــي أُحد البساتين الخاصة في منطقة الحديد / محافظة ديالى خلال موسمي النمو 2023- 2024 وهـــدفت الـــى دراسة تـــأثير الـرش بالباكلوبيوترازول بالـــــتراكيز0 و250 و500 ملـــغم لتر$^{-1}$ والــــرش بالـــتربتوفان بالتراكيز 0 و25 و50 ملـــغم لتر$^{-1}$ في نمو وحاصل الاصناف الثلاثة، تضمت التجربة 27 معاملة وبثـلاثة مكرات، وعـــدت كل شجرة كوحدة تجريبية وبذلك اصبح عدد الاشجار 81 شجرة وأُســـتخدم التصميم الحقلي Nested وحللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي Genstat وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمال 0.05 وأَظهرت النتائج مايلي:

- تفّوق الصنف الشرابي معنويا فــي متوسط طول السلاميات للأفرع الحديثة لكلا الموسمين و متوسط حــجم الثمرة للموسم الثاني ومتوسط قطر طول الثمرة للـموسم الاول والمـــواد

الصلبة الذائبة الكـــلية لكلا الموسمين على التوالي و النسبة المئوية للسكريات الكلية للموسم الثـاني وفـــي نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية على الحموضة الكلية للـموسم الثاني.

- تميز الصنف الابيض (الكاغدي) بأعطائه اكبر متوسط لعدد الازهار في الفرع الواحد وعـــدد الثمار العاقدة، والتبكيربالوصول الـى النضج الكامل باقصر مدة، وعدد الثمار لكل شجرة، ومـــحتوى العصير مـن حامض الاسكوربك و الفينولات الكلية والكاربوهيدرات الكلية لكلا الموسمين على التوالي.
- تفَّوق الصـــنف الابراهيمي معنويا فـي صفة صلابة الثمار لكلا الموسمين وشـــكل الثمرة والنسبة المئوية للحاصل القابل للتسويق في الموسم الثاني .
- تفَّوق الصنفان الشرابي والابراهيمي معنويا فـــي معدل عـــدد الاوراق لكل ثـمرة لكلا الموسمين ومـــعدل طول الافرع الحديثة للموسم الثاني ومحتوى الاوراق من الكلوروفيل ومـــتوسط وزن الثمرة لكلا الموسمين ومتوسط حـجم الثمرة للـموسم الاول ومـتوسط قطر وطـــول الثمرة للموسم الثاني و شكل الثمرة للموسم الاول وحاصل الشجرة الواحدة القابل للتسويق للموسم الثاني وانخفاض نسبة الاصابة بدودة الثمارلكلا الموسمين.
- أدَّى رش أَشجار التفاح بالباكلوبيوترازول بالتركيز 500 ملغم لتر$^{-1}$ الى زيادة معنوية في معدل قطر الافرع الحديثة ومحتوى الافرع مـــن الكاربوهيدرات ومتوسط عدد الازهارفي الفـرع الواحد وعـدد الثمار العاقدة ونسبة العقد ومتوسط وزن الثمرة وعـــدد الثمار لكل شجرة وإنخفاض نسبة الثمار المـــتساقطة ومتوسط حجم الثمرة ومتوسط قـطر وطول الثمرة وحاصل الشجرة الواحدة القـــابل للتسويق وإنخفاض نســـبة الاصابة بـدودة الثمار والنسبة المـــئوية للحاصل القابل للتسويق والمواد الذائبة الصلبة الكلية(TSS) والنسبة المئوية للسكريات الكلية، وانخفاض النسبة المئوية للحموضة القابلة للتعادل و محتوى العصير ـن الفينولات الكـلية و محتوى الثمار من الكاربوهيدرات ونسبة المادة الجافة في الثمار في موسمي الدراسة.
- سبب رش التربتوفان بالتركيز 50 ملغم لتر$^{-1}$ زيادة معنوية فـي متـــوسط مساحة الورقة الواحدة ومتـوسط عدد الاوراق لكل فرع والمساحة الورقية الكلية للـــنبات ومـــعدل طـول وقـــطر الأَفرع الحديثة ومحتوى الاوراق مـــن الكلوروفيل و البرولين ومـــتوسط طـــول السلاميات للافرع الحديثة ومـــحتوى الأَوراق من IAA وعـدد الثمار العاقدة ونسبة العقد و متوسط وزن الثمرة وعدد الثمار لكل شجرة، وإنـــخفاض النسبة المئوية للثمار المتساقطة و حـــجم الثمرة ومتوسط قطر وطول الثمرة وحاصـــل الـشجرة الواحدة الـــقابل للتسويق وانخفاض صلابة الثمار وانخفاض نسبة الاصابة بدودة الثـــمار والنسبة المئوية للحاصل القابل للتسويق ونـسبة المـواد الذائبة الصلبة الكلية (TSS) والسكريات الـــكلية وانـخفاض

نـــسبة الحموضة القابلة للتعادل ومـــحتوى العصير مـــن حامض الاسكوربك ومـحتوى العصير مـــن الفيـــنولات الكلية ونـسبة الـمواد الصـــلبة الذائبة الكلية \ الحموضة الكلية ومحتوى الثمار من الكاربوهيدرات ونسبة المادة الجافة في الثمار في كلا الموسمين.

التجربة الاولى

المقدمة

زادَ الأَهتمام بدراسة التنوع الوراثي لأصنــاف التفاح المزروع في مختلف مناطق العالم ، اذ تـــم توصيف عدد كبير من الاصناف على المستوى المظهري ويحاول مربو النبات فـــي جميع انحاء العالم انتخاب اصناف جديدة متميزة وتثبيت البصمة الوراثية لها واضافتها الى البنك الجيني الخاص بالتفاح، ومع ذلك لا يوجد سوى عــدد قليل مــــن الاصناف التي تنتج على مستوى تجاري ثبتت بصمتها الوراثية رغم ان الدول المنتجة للفاكهة اولت اهتماما كبيرا بتوثيق وحفظ وتعريف هذه المصادر لغرض الاستفادة منها فـــي برامج التحسين الوراثي للأصناف والانواع المزروعة (Larsen واخرون، 2024).

تـُعد معظم سلالات التــفاح المـــزروع ثنائيـــة المجموعة الصـــبغية (Diploids) (2N=2X=34) وهـــي غير مـــتوافقة ذاتيا بصورة كلية او جزئية (Liu واخرون، 1998) لذا نحتاج الى تثبيت المحتوى الوراثي لها للتغلب على ظاهرة عدم التوافق واستبعاد المتماثلة فيما بينها، كون ان السوق في الوقت الراهن يحتاج الـــى أَصـــناف ذات انتــاجية عـــالية بشكل منـــتظم وذات جودة عالية فضلاً عن ذلك يرغب الباحثون والمربون بالأصناف المتوافقة والمقــــاومة للآفات والامراض ولها قدرة على تحمل مشاكل التخزين.

إنَّ التوصيف الجزيئي لبعض طرز التفاح المـــدروس يمكن الباحثين مـــن وضـــــع الهوية الوراثية لـــهذه الطرز وتوثيقها وفك الالتباس في اصلها ودرجة التقارب بينها، ومـــن ثـم تقليل معظم الصعوبات التـــي تظهر نتيجة الاعتـــماد على التوصيف المـورفولوجي فقــط وان تحـــديد التباينات الوراثية الموجودة بيـــن الـــطرز سيوضح مدى تأثير البيئة والتوزيع الجغرافي في التركيب الوراثي للنوع الواحد، كمـا إنَّـه يسهم فـــي ربط المــعطيات الوراثية الناتجة عـــن تحليل الـDNA بالصفات المظهرية والإنتاجية وهذا يساعد في تحديد الطرز الوراثية المتميزة ذات الصفات المرغوب بها (Cicek واخرون، 2025).

يمكن تحديد هـــدف العمل الجزيئي في هذه الدراسة بحصـــر الطرز المـــنتشرة مـــن التفاح فـــي موقع الدراسة وتوصيفها جزيئيا وتثبيت البصمة الوراثية لها وتحديد مدى القرابة الوراثية بينها.

2- مراجعة مصادر

2-1- التصنيف والتسمية.

ينتمي جنس Malus الــــــى العائلة الوردية التي تنقسم تقليديا الى أَربع عائلات فرعية على أَساس نوع الثمار. وتغــير التصنيف للعائلة الوردية علـــــى مر الســـنين واضــيف التحــليل الجزيئي لمعرفة مجموعة الفصائل الفرعية وأَستخدمت بيانات تسلسل النيــوكليوتيدات المأخوذ مـن الاحماض النووية والبــلاستيدات الخضراء ل88 جنسا مــــن الورديات، وتمَّ اعادة تصنيف العائلة الوردية الى ثلاث فصــــائل فرعية وبالتالي فان احـــدث تصنيف لعائلة Rosaceae يعتمد على ثلاث عائلات فرعية علــى الرغم من ان الـــتعريف التقليدي للعائلات الفرعية الاربعة الرئيسية قد ينهار مــن وجهة نظر تصنيفية ، الا ان هذا له فائدة كبيرة مــــن وجهة نظر اقتصادية وبستانية ولا يزال يستخدم بشكــــل شائع. يــتم تنظيم جنس Malus حاليا فـــي ستة اقسام تصنيفية احداها التي ينتمي اليها النوع *Malus domectica* (Usda-ARS، 2018) فــي المجمل تم ذكر59 نوع من Malus فــــي قاعدة بيانات لشبكة معلومات موارد البلازما الجرثومية التــــابعة لوزارة الزراعة الامريكية (GRIN) ومع ذلك فان عدد الانواع المدرجة في الجنس Malus هو موضــــوع نقاش مستمر ويعتقد أنَّ التفــــــاح المزروع *Malus domestica* هو نتيجة تهجين بـين الانواع وتــم قبول الاسم الثاني *Malus domestica* Borkh بشكل عــام باعتباره الاســـم العلمي المنـاسب ليحـــل محــــل الاسم العـــلمي السابق (Qian وآخرون ، 2010) وأنَّ معظـــــم الاصناف هـي ثنــــائية الصبغات (2n) فــي حين ان بعضها ثـلاثي الصـــبغات (3n) وقليــل منـــها رباعي الصـــبغات (4n) (Rieger، 2006 و Hancock وآخرون 2008).

2-2- التوصيف الجزيئي.

فـــــي العقدين الماضيين إجري التوصيف الجزيئي كبديل أَو وسيلة إضافية لـتمييز تنوع أَصناف التفاح ، وهو يعتمد عـــلى التحليل المباشر للحامض النووي والذي يمكن عزله من أَنسجة النبات والتـــي لا تتـــأثر بالــــتأثيرات البـــيئية بغض النظر عــــن المرحلة العمرية للشجرة (Guilford وآخرون، 1997 و Hokanson وآخرون، 1998).

هناك تقديرات تشـير الى تـــوثيق أَكثر من 10000 صنف مـــن التفاح وشهدت أَوروبا أَعلى تنوع لأصنــــاف التفاح فـــي اواخر القرن التاسع عشـر عنـــدما تــَمَّ زراعة العديد مــــن الاصناف المــحلية المختلفة في العديد مــــن البساتين الصغيرة (Luby، 2003). ومــن المرَّجح أنَّ عــدد

الاصناف المعروفة فـــي انكلترا تجاوز 2500 صنف، فيما يوجــد في الاتحاد السوفيتي السابق اكـــثر من 6000 صــنف (Juniper وآخرون ، 1998)، وفـي الولايات المتحدة التي تمثل مركزا ثانويا لتنوع أصناف التفاح تم ادراج اكثر مـن 7الاف صنـــف من التفاح بين عامي 1804و1904 (Janisk ، 2005).

ظهـرت مـــؤخرا الحاجـة الماسـة لطـــرائق تصـنيفية دقيقـــــة وحديثـة لإيجـاد الحلـول للمشاكل التصنيفية الناتجة عــن استـــخدام الطرائق التقليدية والـــقديمة خـــاصة فـــي الانـــواع المتشابهة مورفولوجيا والطـرز التابعة لنوع واحــد أو اكثر وقـد ادى تطـور التقـنيات لاسيمـــا انــظمة الترحيل الكهربائي والتفـــاعل التسلســلي للبوليمير Polymerase Chain Reaction (PCR) والمـــؤشرات الجــزيئية الــــى تطور متسارع فــــي توصــــــيف النــباتات ومعرفة القــــرابة الـــوراثية بيـــنها وتثبيت البصـمة الوراثيـة لهـا وهــــي الوســـيلة الاكـــــثر دقـــــة لكشــــــف التباينات الوراثية علــى مستوى الDNA كتـــقـــنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) وتقــنية RAPD (Random Polymorphic DNA) Amplified المــــطورة مــــن قبـــــل Welsh and Mcclelland عـــــام 1990 وتقنيـة SSR (Simple Sequence Repeats) وتقـــنية (Restriction Fragment Length Polymorphism) RFLP. وقــــد استخدمت جميـــع هــــذه التقنيات لتحديد التباينـات الوراثيـة بـين الانـواع التابعـة لتحــــت الفصـيلة الـــتفاحية ومنهـا الــــتفاح (Modgil واخرون ، 2005 و Iannaccone وآخرون ، 2007).

أجريت العديد من الدراسـات الحديثـة علـى المستوى الجزيئـي لتحديد التبـاين الجزيئـي بـين طرز التفاح وتحديد البصمة الوراثية لها ومنها الدراسة التي قام بها Hassani واخرون (2022) بدراسة التنوع الوراثي على المستوى الجزيئي لـ 33 نمط جيني من التفاح الإيراني باستخدام 14 بـادئ مـن مؤشـرات SSR وقد أظهـرت جميـع البادئـات حـزم متباينـة وبلـغ مجمـوع الحـزم لجميـع البادئـات 83 حزمـة، وأظهـرت الأنمـاط الجينيـة لشـهرود 20 وشـهرود 21 أعلـى تشـابه بينهـا بلـغ 95%، فيمـا سـجّل شـهرود 3 والملايـر الفلسـطيني أدنـى تشـابه بينهـا بلـغ 14 % وبنـاء علـى نتـائج معامل التشابه تم رسم مخططات شجرية للبيانـات الجزيئيـة باسـتخدام طريقـة UPGMA، وقُسِّمت الأنماط الجينية إلى ست مجموعات رئيسة موزعة حسب درجة التشابه بين المادة الوراثيـة للأنمـاط الجينية وهذا يدل على قدرة التقنيات الجزيئية في دراسة التنوع الوراثي في التفاح.

اجرى Sharma واخرون(2023) دراسة حول التنوع الجيني والمظهري لـ 70 نمطًا وراثيًا متنوعًـا مـن التفـاح بهـدف تحليل التنـوع الجينـي وتحديـد المواقـع الجينيـة المرتبطـة بصـفات جـودة

الفاكهة المهمة. استُخدم ما مجموعه 140 بادئًا من بادئات SSR، اظهر 88 بادئًا فقط حزم متباينة وقد قسّم مخطط الشجرة المبني على التباين الجزيئي الأنماط الجينية إلى مجموعتين رئيسيتين. ولوحظ تباين ظاهري كبير في صفات جودة الثمار للأنماط المدروسة، وُجد معامل ارتباط مهم بين التصنيف الجزيئي للأنماط الجينية وتقسيمها على مستوى الصفات المظهرية.

هدفت الدراسة التي اجراها Larsen وآخرون(2024) إلى تثبيت البصمة الوراثية لـ 652 سلالة تفاح محفوظة في المخزن الجيني الوطني في هولندا، ومقارنة معلوماتها الجينية ببعضها البعض، واعداد قاعدة بيانات كبيرة لأصناف التفاح في جميع أنحاء العالم لتحديد النسخ الجينية المكررة وعلاقات النسب لأصناف التفاح الهولندية، باستخدام 15 بادئ من مؤشرات SSR وتقنية DNA Sequencing وُجد 211 (51.1%) من الأنماط الجينية تعود للأصناف الهولندية وان هناك أنماط جينية متشابها مع بعضها وهناك أنماط أخرى دخيله على الأصول الهولندية أي مدخلة، وبهذا فقط كانت للتقانات الجزيئية المستخدمة دور وكفاءة في التمييز بين الأنماط الجينية المختلفة من التفاح وتثبيت البصمة الوراثية لها.

قام كل من Guseinova و Asadova (2024) بدراسة التنوع الجيني لأصناف التفاح المحلية الشائعة في أذربيجان، من خلال دراسة الخصائص البيومورفولوجية، وتحديدها بناءً على الواسمات الجزيئية، وتحديد درجة العلاقة الوراثية بين أنواع وأشكال أصناف التفاح. بناءً على تحليل الحمض النووي لها حُدّد التنوع الوراثي بينها بالاعتماد على نتائج مؤشرات الـ SSR، وحُسب البعد الوراثي بين العينات وقد وُجد أن قيم معاملات التشابه بين العينات المدروسة تتراوح بين 0 و0.7، في حين كان معامل التشابه مرتفعًا للأصناف ذات الأصل المشترك وقد وزعت الأصناف الى مجاميع حسب درجة التشابه.

استخدم Cicek واخرون (2025) مؤشرات SSR وتقنية DNA Sequencing لتحديد التنوع الوراثي بين 169 نمط وراثي مدخل من التفاح مع 11 صنفا معتمد في كرواتيا وتثبيت البصمة الوراثية لها، وقسمت الأنماط الى مجموعات وراثية مختلفة بالاعتماد على محتواها من الناحية والوراثية، كما اعتمدت الصفات المظهرية للأنماط لمقارنة النتائج مع ما توصل اليه توزيعها على المستوى الجزيئي وكان هناك توافق بين المؤشرات الجزيئية والمظهرية في دراسة التنوع الوراثي للتفاح.

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المادة النباتية وموقع الدراسة:

أُجريت الدراسة علـــى مجموعة من الطرز المزروعة فــي منطقة الحديد فــي محافظة ديالى (ثلاث طرز وراثية) منتشــرة فَـــي موقع الدراسة وهـــي الشرابي والتفاح الابيض(الكاغدي) والتفاح الابراهيمي.

3-2- جمع العينات النباتية وحفضها:

أَخذت عينة من النموات الحديثة للأوراق لكل صنف مدروس وغسلت جيدا بالماء المقطر وعقمت بالكحول وحفظت لحين نقلها الى مختبر شركة وهج الدنا فـــــي بغداد وأعطيت الارقام 1 للصــنف الشرابي و2 للصنف الابيض و3 للصنف الابراهيمي.

جدول 1 يبين ترقيم الطرز الوراثية المدروسة

ترقيم المختبر	ترقيم الباحث	DNA Extraction	PCR ITS-650bp
1	1= الصنف الشرابي	+	+
2	2= الصنف الابيض	+	+
3	3= الصنف الابراهيمي	+	+

3-3 - الاجهزة والمواد المستعملة (Instruments and Materials)

يبين جدول 2 الاجهزة والمواد المستخدمة في استخلاص DNA من العينات المأخوذة من النباتات مع اسم الشركة وبلد المنشأ .

جدول2 يبين الاجهزة والمواد المستخدمة

	Material	Cat #	Company
1	Agarose	8100.11	Conda / USA
2	Red safe staining souluion	21141	Intron / Korea
3	6X Loading dye	21161	Intron / Korea
4	Ladder 100 bp	24073	Intron / Korea
5	Pre mix pcr	25025	Intron / Korea
6	TBE buffer 10 X	IBS.BT004	Conda / USA
7	Primer	---	Integrated DNA technologies /USA
8	ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™	D6020	Zymo / USA

3-4- التشخيص الجزيئي للنباتات (Molecular Diagnosis of plants)

الجدول3 يوضح عدة استخلاص الحامض النووي DNA من النبات بحسب تعليمات الجهة المرسل اليها العينات

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	-

3-5- استخلاص الحامض النووي DNA.

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

1- أُضيف ما يقارب 150 ملغم من عينة الاجزاء النباتية الى أنبوب تحليل ZR Bashing Bead™ وأُضيف750 مايكرولتر من محلول التحليل الى الانبوب.

2- يوضع الانبوب في جهاز دوران بمجموعة حامل انبوب سعة 2 مل .

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

4- نقلَ ما يصل الى 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- أُضيف 1200 مايكرولتر من منظم حزم DNA (DNA Binding Buffer) الى المرشح الموجود في انبوب التجميع من الخطوة الرابعة وخلطه.

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

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

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

10- نقلَ 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- نقلَ 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، وبهذه الحالة يكون DNA المرشح جاهزا لتطبيقات PCR والتطبيقات الاخرى.

شكل1 يبين DNA نقي جاهز للتفاعل pcr

شكل2 علامات الحامض النووي

شكل 3 التحليل الكهربائي للهلام لاستخلاص الحمض النووي من النبات

3-6- نقاء وتركيز الحامض النووي .

يعد قياس إمتصاص العينة عند 260 نانومتر من أكثر الطرائق إستخداما لتقدير تركيز الاحماض النووية إذ تستجيب نسب الامتصاص 260/280 و260/230 و260/325 لتحديد نقاء الحامض النووي ووجود الملوثات في العينات البايولوجية اثناء عملية إستخلاص الحامض النووي الطريقة الاكثر فائدة لتقدير تركيز الحامض النوووي ونقائه هي من خلال قياس الامتصاص لحجم العينات الصغير باستخدام مطياف Nano Drop، تَمَّ قياس نقاوة وتركيز الحامض النووي DNA باستخدام جهاز الطيف المرئي Spectrophotometer عند اطوال موجية 260 و280 نانوميتر (تعليمات الشركة).

3-6-1- نقاوة وتركيز الـ DNA

أُستخدم Nano Drop لقياس العينات نضع 2 مل من الحامض النووي المحضر على القاعدة ونغلق الغطاء وننقر فوق القياس ويجب التأكد من تسجيل التركيز والنقاء ويكرر ذلك مع كل عينة مع ملاحظة أنَّ قياس النقاء بطول موجي 260/280 يتراوح النقاء الجيد بين 1.80 الى 2.00 .

جدول 4 يوضح تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA في العينات

رقم العينة	ترقيم الطالب	تركيز الحامض النووي (ng/ml) .	النقاوة 260/280
1	1	1.5	1.806
2	2	1.8	1.801
3	3	2.8	1.818

3-7- البادئات Primres

جُففت البادئات بالتجميد ثم إذيبت في ddH_2O الحر لإعطاء تركيز نهائي 100بيكو (مول مايكرولتر$^{-1}$) كمحلول اساسي والحفاظ على المخزون عند -20 لتحضير تركيز 10بيكو كمحلول اساسي معلق نستخدم 10مايكرولتر من المحلول الاساسي في 90 مايمررولتر من ماء ddH_2O الحر للوصول الى الحجم النهائي 100مايكرولتر.

3-7 -1- البادئات المستخدمة للتفاعل البادئ المحدد للجين ITS للجين .

جدول 5 البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحص الPCR

Primer	Sequence	T_m (°C)	GC (%)	Product size
Forward	5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′	60.3	50 %	510-870 base pair
Reverse	5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	57.8	41 %	

3-8- تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

تم اجراء تضخيم PCR بحجم قدره 25 مايكرولتر يحتوي على 1.5 مايكرو لتر من الحامض النووي و5.0 مايكرولتر (Korea, Taq PCR PreMix Intron) و1.0 من البادئ الامامي والعكسي (Majidواخرون 2016) ثُمَّ تمت إضافة الماء المقطر في الانبوب الى الحجم الكلي من 25 مايكرولتر أُجري التفاعل في الظروف الحرارية التالية باستعمال Thermocycler الحراري (Applied Biosystem , PCR System 9700,GeneAmp)

جدول 6 حالات الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler

No.	Phase	Tm (°C)	Time	No. of cycle
1-	Initial Denaturation	94°C	5 min.	1 cycle
2-	Denaturation -2	94°C	40 sec.	35 cycle
3-	Annealing	52°C	40 sec.	
4-	Extension-1	72°C	40 sec.	
5-	Extension -2	72°C	7 min.	1 cycle

3-9- الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (Agarose gel electrophoresis)

اجريت عملية الترحيل وفقا ل Sambrook (1989) وكالاتي:-

1- حُضّر هـــــلام الاكاروز بنسبة 1.5 % عن طريق اذابة 1.5غم مـــن هلام الاكاروز في 100مل من المحلول TBE buffer الدارئ المحضر مسبقا ويتم تسخين الاكاروز بدرجة حرارة تصل الى درجة الغليان ويتحول الاكاروز الـــــــى الشكل الرائق ويستـــعمل جهاز Microwave لمدة 5دقائق.

2- ترك الخليط ليبرد عند (45-50م) وبعدها يضاف اليه 3مايكرولتر مـــن صبغة الحامض النووي المشعة Red safe Nucleic acid staining ومزجت جيدا مع الهلام.

3- سكب الجل في قالب الصب وثبت المشط لعمل الثقوب المخصصة لحـــمل العــينات ويترك لمدة 30دقيقة ليبرد وبـــعدها يتم ازالة المشط بلطف من الاكاروز الصلب ثم تثبت اللوحة على حاملها في الوحدة الافقية لجهاز الترحيل الكهربائي ممثلة بالخزان المستعمل في الجهاز

4- حُمِلت العينات الناتجة من فحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- أُستعمل 100من DNA ladder لقياس ناتج PCR product وتوضع في الحفرة الاولى.

6- بعد إكتمال عملية التحميل غمـــــرت هلام الاكاروز باستعمال محـــلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغـــلق غطاء الترحيل وجـــرى تشغيل جهاز الترحيل بتيار 7 فولت \سم2 لمدة 1-2ساعة حتى وصلت الصبغة الـــــى الجــانب الاخر من الجل وبذلك اكتملت عملية الترحيل.

7- بعد إنتهاء عمـــــلية التـــــرحيل فحص الهلام الحاوي على الPCR باستخدام UV transillumination بطول موجي 336 نانومتر.

3-10- تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف

1- أُرسلت نواتج الحامض النووي (PCR-amplified products) المضـــاعفة الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل للعينات مـــــــع البوادئ الامامية والخلفية (ITS4,ITS1) والتي تستعمل فــــي المضاعفة الكاملة لمنطقة region ribosomal internal transcribed spacer (ITS) المــهمة في تشخيص النبات الى شركة Macrogene في كوريا الجنوبية لتحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للعينات.

2- حُللت الشجرة الوراثية والتماثل (symmetry) للنباتات الـــمدروسةَ، وتَّم تحديد الشجرة للنباتات قيد الدراسة باستعمال برنامج Chromas لمعرفة التشابه والاختلاف بين النباتات

3- المشخصة والنباتات المســـــجلة عالميا وحـــددت الشجرة الوراثية للنباتات بتتابع القواعد النايـــــتروجينية (Nucleotide sequence) لـــحزم الحامض النـــووي المـضاعف وبالاستعانة بــبرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني .

4- سجلت النباتات المشخصة في البنك الجيني العالمي للمعلومات التقانة الحيوية National Center For Biotechnology Information (NCBI) في الولايات المتحدة.

جدول 7 مكونات PCR

Material	Volume
i-Taq DNA Polymerase	5U/µl
DNTPs	2.5mM
Reaction buffer (10X)	1X
Gel loading buffer	1X

جدول 8 خليط من التفاعل النوعي لجين التشخيص

Components	Concentration
Taq PCR PreMix	5µl
Forward primer	10 picomols/µl (1 µl)
Reverse primer	10 picomols/µl (1 µl)
DNA	1.5µl
Distill water	16.5 µl
Final volume	25µl

3-11- التحليل الاحصائي

حُللت نتـائج التوصيف الـــجزيئي بالبــرنامج الاحـــصائي NTSY (Rohif, 2002) وتم اجراء التحليل العنقودي (Cluster analysis) وأُستـــخدمت النيوكليوتيدات الواضحة فقط في التحليل الاحصائي وذات الوزن الجزيئي بين 100-1500 bp وأُعطي رقم 1 للنيوكليوتيدات الموجودة ورقم 0 للنيوكليوتيدات الغائبة ، واعتمد التحليل العنقودي على نسبة عـــدم التشابه الوراثي لرسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة على شكل عنقودي (Dendogram).

.

4-4- النتائج والمناقشة Result and discussion

1-4 التشخيص الجزيئي للنباتات Molecular Diagnosis of plants

أَظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أنَّ النباتات المستخدمة في هذه الدراسة احتوت علـى حزمـة منفـردة مـن الحـامض النـووي المسـتخلص وقـــيست نقاوتـه عنـد اطـوال موجيـة 260و280 نانومتر باستخدام جهاز الطيف المرئي، وان نتـائج التحليل للجين لمنطقة ITS موجبة لجميع النباتات كما موضح في الشكل 4.

شكل 4 ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم شريط 650 زوج قاعدي

2-4 العينة الاولى (التفاح الشرابي)

أَظهر البادئ المستخدم كفاءة عالية فـــي كشـــف تتابعات النيوكلوتيدات في DNA العينة اذ أعطت نســبة تماثل وصلت الى 97% فـــي هـــذه العينة وكان عدد النيوكلوتيدات المتماثلة 376 حزمة وعـــدد النيوكلوتيدات غير المتماثلة 11 مــن مجموع 387 حزمة كما في الشكل 5 .

```
Query  1    TTCAACTTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCCGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82   TTCAACTTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCCGC  141

Query  61   TCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAGCG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142  TCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAGCG  201

Query  121  CGCTCCTGCCGCCCCGGAATCGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTCAA  180
            |||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  202  CGCTCCCGCCGCCCCGGAATCGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTCAA  261

Query  181  AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  262  AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCG  321


Query  241  ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGACCGCAAGTTGCGCC  300
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||
Sbjct  322  ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCC  381

Query  301  CGAAGCCATCAGGTCGACGGCACGCCTGCCTGGGCGAAACAAACCGTTGcccccccGCCC  360
            ||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||  |||  ||||||||||||||| |
Sbjct  382  CGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCGCGC  441

Query  361  ATCCCTCGGGAACGTCGGGGGACGGAC  387
            ||||||||||| ||||||||| |||||
Sbjct  442  ATCCCTCGGGAGCGTCGGGGGGCGGAC  468
```

شكل 5 يبين النيوكليوتيدات المتماثلة وغير المتماثلة للصنف الشرابي

4-3- العينة الثانية (الصنف الابيض)

أظهرت عينة الـ DNA الثانية والتي تمثل الصنف الابيض 270 نيوكليوتيده متماثلة و 4 نيوكليوتيدات غير متماثلة وبنسبة تماثل بلغت 99% كما موضح في الشكل 6.

```
Query  1    GTTTCAACGTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  80   GTTTCAACGTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCC  139
Query  61   GCTCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  GCTCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAG  199
Query  121  CGCGCTCCTGCCGCCCCGGAAACGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  CGCGCTCCTGCCGCCCCGGAAACGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTC  259
Query  181  AAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  AAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG  319
Query  241  CGATAATTGGAGTGAATTGCAAAATCCCATGAAC  274
Sbjct  320  CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAAC  353
```

شكل 6 يبين القواعد النايتروجينية المتماثلة وغير المتماثلة لصنف التفاح الابيض

4-4- العينة الثالثة (الصنف الابراهيمي)

العينة الثالثة والتي تمثل الصنف الابراهيمي وصلت نسبة التماثل الى 94% اذ كان عدد النيوكليوتيدات الكلي 251 نيوكليوتيدة وعدد النيوكليوتيدات غير المتماثلة 14 نيوكليوتيدة وعدد النيوكليوتيدات المتماثلة 237 كما في الشكل 7.

```
Query  1    TTTCAACTTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81   TTTCAACTTCGGGGGTCGGCGGGCCTCCTGGCCCGGCGTCCCCTTCGTCCCGGGAGCCCG  140
Query  61   CTCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141  CTCCCGGGCGTACAAACTTACACCGGCGCGTGTTGCGCCAAGGAATCTGAACGAAAGAGC  200
Query  121  GCGCTCCCGCCGCCCCGGAATCGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTCA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201  GCGCTCCCGCCGCCCCGGAATCGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCGATAAGTCA  260
```

```
Query  181  AAACAACTCTCGGCAACGGATATCTCAGCTCAAGCTTCGATAATGAATGTTTCGACAAGC  240
            |||| ||||||||||||||||||||| ||||  || ||||| | ||| ||  ||| | ||
Sbjct  261  AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC  320

Query  241  GAAAATTGGTG  251
            || | ||||||
Sbjct  321  GATACTTGGTG  331
```

الشكل 7 يبين القواعد النايتروجينية المتماثلة وغير المتماثلة للصنف الابراهيمي

5-4 - التغايرات الوراثية على المستوى الجزيئي للعينات المدروسة بالمقارنة مع العينات العالمية المسجلة.

يوضح الجدول 9 ان العينة رقم 1 للصنف الاول (الشرابي) *Malus domestica* والتي حملت التسلسل PQ334650 في البنك الجيني تحتوي على خمسة تغايرات من نوع Transition في الموقع (280 و395 و424 و453 و463) و6 تغايرات من نوع Transversion في المواقع (368 و399 و 418 و 419 و423 و440) وكانت نسبة التطابق 97% مع العينة MH633850.1 العالمية.

اما العينة رقم 2 للصنف الثاني (الابيض) والتي حملت التسلسل PQ334643.1 في البنك الجيني فكانت تحتوي على 4 تغايرات اثنان من Transition في المواقع 341 و348 واثنان من النوع Transversion في المواقع 325 و330 وكانت نسبة التطابق 99% مع العينة MH633852.1 العالمية.

والعينة 3 للصنف الثالث (الابراهيمي) والتي حملت التسلسل PQ334622.1 في البنك الجيني تحتوي على 14 تغاير 5خمسة من نوع Transitionفي المواقع 265 و 287 و302 و308 و312 والباقي من نوع Transversion في المواقع 292 و293 و296 و304 و311 و316 و318 و323 و325 وكانت نسبة التطابق 94% مع العينة MH633850.1 العالمية.

الجدول 9 يبين النيوكليوتيدات غيرالمتماثلة ومواقعها والنسبة المئوية للتشابه.

Malus domestica						
No.	**Type of substitution**	**Location**	**Nucleotide**	**Sequence ID with compare**	**Source**	**Identities**
1	**Transition**	**208**	**T\C**	MH633850.1	**Malus domestica isolate Farnese clone 3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**	**(97%)**
	Transversion	**368**	**C\A**			
	Transition	**395**	**T\C**			
	Transversion	**399**	**C\G**			
	Transversion	**418**	**A\T**			
	Transversion	**419**	**A\C**			
	Transversion	**423**	**A\C**			
	Transition	**424**	**A\G**			
	Transversion	**440**	**C\G**			
	Transition	**453**	**A\G**			
	Transition	**463**	**A\G**			
2	**Transversion**	**325**	**A\C**	**MH633852.1**	**Malus domestica isolate Farnese clone 4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**	**(99%)**
	Transversion	**330**	**A\T**			
	Transition	**341**	**A\G**			
	Transition	**348**	**A\G**			
3	Transition	**265**	**A\G**	**MH633850.1**	**Malus domestica isolate Pedreschi clone 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**	**(94%)**
	Transition	**287**	**A\G**			
	Transversion	**292**	**A\T**			
	Transversion	**293**	**A\C**			
	Transversion	**296**	**T\A**			
	Transition	**302**	**A\G**			
	Transversion	**304**	**T\A**			
	Transition	**308**	**T\C**			
	Transversion	**311**	**T\A**			
	Transition	**312**	**T\C**			
	Transversion	**316**	**C\A**			
	Transversion	**318**	**A\T**			
	Transversion	**323**	**A\T**			
	Transversion	**325**	**A\C**			

6-4 تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلومات الحيوية والشجرة الوراثية Phylogeny

بَيَّنت النتائجُ أَّن تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعف وباستخدام برنامج Mega/6 and N.S.B.I عند مقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني للمعلومات التقانة الحياتية NCBI والعائد للعينة رقم 1 (التفاح الشرابي) المشخصة والمسجلة في البنك الجيني المطابقة مع الطرز العالمية لكل من سويسرا وايطاليا والمملكة المتحدة وبنسبة 97% وتطابقت العينات مع المملكة المتحدة وسويسرا بنسبة 96%، وبـَيَّن تحليل الشجرة الوراثية للصنف الثاني (التفاح الابيض) مطابقتها مع الطرز العالمية لكل من سويسرا وايطاليا والمملكة المتحدة بنسبة 97% ومع المملكة المتحدة وسويسرا بنسبة 96% ، واوضح تحليل الشجرة الوراثية للصنف الثالث (التفاح الابراهيمي) تطابق مع الطرز العالمية لكل من سويسرا وايطاليا والمملكة المتحدة بنسبة 97% ومع المملكة المتحدة وسويسرا بنسبة 96% (جدول 10).

يبين الشكل 8 ان الطرز المحلية المدروسة والعالمية المسجلة في البنك الجيني انقسم بالاعتماد على نتائج جدول 11 والمعتمد على محتوها الوراثي الى مجموعتين رئيستين شملت المجموعة الأولى الطراز العراقي الأول (الشرابي) حيث مثل مجموعة مستقله وهوه الابعد وراثياً عن كل الطرز الأخرى، في حين تجمعت بقية الطرز في المجموعة الرئيسية الثانية والتي بدورها انقسمت الى مجموعتين ثانويتين شملت الأولى ثلاثة طرز بضمنها الطراز المحلي الثالث (الابراهيمي) ، اما المجموعة الثانوية الثانية فقد انقسمت الى ثلاث مجاميع تحت ثانوية شملت اربع طرز منها الطراز العراقي الثاني (الابيض) وهو الأقرب لمعظم الطرز العالمية، ومن النتائج السابقة نستنتج ان هناك اختلافات على المستوى الجزيئي بين الطرز العراقية الثلاثة كونها وقعت في مجاميع مختلفة.

بينت المعلومات التي وفرها بنك المعلومات الجيني العالمي ان الطرز الثلاثة قيد الدرسة لم تسجل في البنك الجيني للمركز الوطني للمعلومات التقانة الحياتية (NCBI) على مستوى العراق لذا تم تسجيلها باسم الباحث والسادة المشرفين كأول تسجيل في العراق وفق ما مبين في ادناه:

جدول 10 يبين النسبة المئوية للتشابه الوراثي بين الطرز المحلية قيد الدراسة مع الطرز العالمية.

	ACCESSION ID	Country	Source	Compatibility
.1	PQ334650. Malus domestica	iraq1	Malus x domestica	
.2	HQ836638.1 Malus x domestica	switzerland		97%
.3	AF186482.1 Malus domestica	UK		96%
.4	HQ836651.1 Malus x domestica	switzerland		96%
.5	MH633846.1 Malus domestica	Italy		97%
.6	AF186484.1 Malus domestica	UK		97%
.7	PQ334643.1 Malus domestica iraq2	Iraq2	Malus x domestica	
.8	HQ836638.1 Malus x domestica	switzerland		97%
.9	AF186482.1 Malus domestica	UK		96%
.10	HQ836651.1 Malus x domestica	switzerland		96%
.11	MH633846.1 Malus domestica	Italy		97%
.12	AF186484.1 Malus domestica	UK		97%
.13	PQ334622.1 Malus domestica iraq3	iraq3	Malus x domestica	
.14	HQ836638.1 Malus x domestica	switzerland		97%
.15	AF186482.1 Malus domestica	UK		96%
.16	HQ836651.1 Malus x domestica	switzerland		96%
.17	MH633846.1 Malus domestica	Italy		97%
.18	AF186484.1 Malus domestica	UK		97%

شكل 8 شجرة التطور الوراثي للأصناف المحلية مع السلالات العالمية الاخرى

جدول 11 يوضح التطور الوراثي للأصناف المحلية مع السلالات العالمية الاخرى

File Display Average Caption Help

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. HQ836638.1 Malus x domestica								
2. AF186482.1 Malus domestica	0.0304347826							
3. HQ836651.1 Malus x domestica	0.0216450216	0.0238095238						
4. MH633846.1 Malus domestica	0.0271739130	0.0195121951	0.0060975610					
5. AF186484.1 Malus domestica	0.0174672489	0.0120000000	0.0095693780	0.0049019608				
6. PQ334650.1 Malus domestica iraq1	0.0672268908	0.0414746544	0.0614754098	0.0000000000	0.0277777778			
7. PQ334643.1 Malus domestica iraq2	0.0041841004	0.0137614679	0.0246913580	0.0174418605	0.0046082949	0.0680000000		
8. PQ334622.1 Malus domestica iraq3	0.0126582278	0.0231481481	0.0081632653	0.0058823529	0.0093023256	0.0600000000	0.0160642570	

Abstract

This study was conducted on four-year-old apple trees belonging to three local varieties: Sharabi, Al-Abyad (Al-Kagdi), and Al-Ibrahim, Through two experiments The first experiment was molecular, and the second was field. The first experiment aimed to determine the genetic variation at the molecular level of the three varieties and to establish their genetic fingerprint using DNA sequencing technology. Samples were taken from the recent growth of the leaves of each variety studied, and DNA extraction and analysis were performed. The DNA was amplified in the DNA laboratory in Baghdad, and the results of the molecular characterization were analyzed using the NTSY statistical program. The results showed the following:

- The use of DNA sequencing technology was effective in detecting genetic diversity and establishing the genetic fingerprint of apple varieties.
- The varieties studied differ in their genetic composition, with the Sharabi and Ibrahim varieties being genetically closer to each other and further from the white variety, which was genetically closer to most of the registered international varieties.
- The study showed that the local varieties under study were not registered in the global gene bank, so the local varieties under study were registered in the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and carried the sequences PQ334650 for the Sharabi variety and PQ334643 for the white variety and sequence PQ334622.1 for the Ibrahim variety, as the first registration in Iraq.

The second experiment was field-based and conducted in one of the private orchards in the Al-Hadid region / Diyala Governorate during the 2023 – 2024 growing seasons. It aimed to study the effect of spraying with Paclobutrazol at concentrations of 0, 250, and 500 mg L^{-1} and spraying with Tryptophan at concentrations of 0, 25, and 50 mg L^{-1} on the growth and yield of the three varieties. The experiment included 27 treatments and three replicates, and each tree was counted as an experimental unit, bringing the total number of trees to 81. A nested design was used, and the results were analyzed using the Genstat statistical program. The means

were compared using the least significant difference (LSD) test at a probability level of 0.05. The results showed the following:

- The Sharabi variety was significantly superior in mean internode length of newly shoots for both seasons, the average fruit size for the second season, the average fruit diameter for the first season, the total soluble solids for both seasons, the percentage of total sugars for the second season, and the ratio of total soluble solids to total acidity for the second season.

- The white variety (Kagdi) was distinguished by giving the highest average number of flowers per branch and number of fruits set, reaching full maturity in the shortest time, number of fruits per tree, and juice content of ascorbic acid, total phenols, and total carbohydrates for both seasons, respectively

- The Ibrahim variety was significantly superior in terms of fruit firmness for both seasons, fruit shape, and the percentage of marketable yield in the second season.

- The superiority of the Sharabi and Ibrahimi varieties significantly, the average number of leaves per fruit for both seasons, the average length of new shoots for the second season, leaf chlorophyll content, average fruit weight for both seasons Average fruit size for the first season, average fruit diameter and length for the second season, fruit shape for the first season, marketable yield per tree for the second season, and low fruit worm infestation for both seasons.

- Spraying apple trees with paclobutrazol at a concentration of 500 mg L^{-1} resulted in a significant increase in the average diameter of new shoots and carbohydrate content, average number of flowers per plant, number of set fruits, percentage of set, average fruit weight, number of fruits per tree, low fruit percentage, average fruit size, average fruit diameter and length, and yield per tree marketable yield, fruit worm infestation, percentage of marketable yield, total soluble solids (TSS), percentage of total sugars, percentage neutralizable acidity, juice content of total phenolics, fruit

carbohydrate content, and fruit dry matter percentage in the two seasons of the study.

● The reason for spraying tryptophan at a concentration of 50 mg. L^{-1} Significant increase in average leaf area per leaf, average number of leaves per branch and total leaf area per plant The average length and diameter of modern branches, the chlorophyll and proline content of the leaves, and the length of the phalanges For young branches, leaf IAA content, number of set fruits, percentage of set, average fruit weight and number of fruits per tree.and decrease The percentage of fallen fruits, fruit weight, average fruit diameter and length, and yield per tree marketable yield, low fruit hardness, low percentage of fruit worm infestation, percentage of marketable yield and percentage of marketable yield marketable yield, total solid solids (TSS), total sugars, and low neutralizable acidity The juice contains ascorbic acid, total phenolics,. Total soluble solids/ total acidity, carbohydrate content and dry matter content of the fruits in both seasons.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Diyala
College of Agriculture
Department of Horticulture and Landscape Engineering

Determination of The Molecular Variation of Three local Apple Cultivars and Their Response to Spraying With Paclobutrazol and Tryptophan

A Dissertation

Submitted to The Council of the College of Agriculture University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor Philosophy in Agriculture Science / horticulture Pomology and Olericulture

By

Oday Mohammad Abdullah

Supervised by

Prof. Dr. Ali Mohammad Abd Al-hayany **Dr. Nazar Sulaiman Ali**

1447 A.H **2026 A.D**