Molecular Taxonomical Study of the Species Genus *Phalaris* L. from the Gramineae Family in Iraq.

دراسة تصنيفية جزيئية لأنواع الجنس*Phalaris* L. من العائلة النجيلية (Gramineae) في العراق.

م. د. أبوذر حاتم مجيد
كلية الزراعة / جامعة الكوفة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف تقصي العلاقات الوراثية التطورية النسبية لخمسة أنواع من الجنس *Phalaris* L. في العراق باستعمال تقنية معرفة التتابع لجين البلاستيدات الخضر Sequencing of Gene *Mat*K ، وأظهرت شجرة القرابة الوراثية التوزيع العنقودي لها و انحدار النوع *P.arundinacea* لوحده بكلاد منفرد في قاعدة الشجرة الوراثية وليتآخى فيه مع كلاد النوع *P. paradoxa* ، فيما كانت الأنواع *P.coerulescens* و *P.brachysta* و *P.minor* ضمن كلاد رئيس واحد توزعت فيه الأنواع الثلاثة ضمن كلادات ثانوية و التي جاء فيها النوع *P.coerulescens* بكلاد مفرد واحد في قاعدة الكلاد الرئيس الثاني و ليتآخى فيه مع الكلاد الثانوي الضام للنوعان *P.brachysta* و *P.minor* .

بينت نتائج الدراسة كفاءة تتابعات الجين *Mat*K المستعملة في فصل أنواع الجنس عن الأخر أما التقارب الذي جاءت به بعض الأنواع فيؤكد من عودتها إلى جنس واحد ، وعموماً عززت الدراسة القرابة القوية وأشترك أنواع الجنس *Phalaris* في العراق بسلف مشترك واحد.

Summary

The study was carried out to investigate molecular phylogenetic relationships for five species from the genus *"phalaris"* in Iraq by using sequencing technique of the Chloroplast gene maturase K (*Mat*K).

The results of genetic dendrogram showed a cluster analysis of species and descend of *P.arundinacea* alone in a single clade in the base of genetic dendrogram which consider as a sister clade to the *p.paradoxa* clade .While The three other species *P.coerulescens* ، *P.brachysta* and *P.minor* were included in one main clade and distributed in a secondary subclade . The *P.coerulescens* is descended in a single clade in the base of the secondary main clade and considered as a secondary clade that collecting *P.brachysta* & *P.minor.*

The results showed reliability of sequencing *Mat*k gene which used to separate genus species from each other . While, close relationship in some species indicates that this species belong to one genus . Generally this molecular study confirmed the strong relationship among species that share the same genus *Phalaris* in Iraq in one common ancestor.

المقدمة

تعد العائلة النجيلية أو عائلة الحشائش رابع أكبر العائلات النباتية لمغطاة البذور Angiosperm اذ تميزت نباتاتها بهيمنتها البيئية على غالبية المواطن البيئية و تغطي حوالي 20-40% من سطح الكرة الأرضية [1] .

و تؤدي عمليات التغاير الوراثي وتعدد المجموعات الكروموسومية (polyploidy) و التهجينات (Hybridization) دوراً أساسياً مهماً التنوع الوراثي و التوزيع الجغرافي والتكيفات لعوامل البيئة للأنواع المختلفة [2].

وأن الأهمية البيئية لنباتات العائلة النجيلية تنسجم مع أهميتها الاقتصادية أذ تزودنا نباتات هذه العائلة بحوالي 80% تقريباً من مجمل الغذاء العالمي السنوي [3].

وعد جنس الحشائش الصفراء *Phalaris* الجنس المثالي ideal genus ضمن النجيليات و هو من الأجناس الجديرة بالملاحظة لانتشاره في مختلف الأنماط أو المواطن الجغرافية إذ يستوطن العديد من القارات (Continents) و يتراوح بالانتشار من المناطق المعتدلة لكلا نصفي الكرة الأرضية الشمالي و الجنوبي إضافة إلى الجبال الأفريقية الاستوائية و أمريكا الجنوبية .

يضم الجنس 21 نوعاً تميزت بتنوعها الكبير ليس على مستوى مناطق البحر المتوسط و أمريكا الشمالية بل توسعت إلى قارات أسيا و أفريقيا و أمريكا الجنوبية وهي تشغل كل المناطق البرية و المساحات المتفرقة أو قليلة النباتات disturbed areas للمناطق المعتدلة وشبه الاستوائية ، وبصورة عامة تنمو أنواع الجنس *Phalaris* في الذرى الواطئة الارتفاعات إلى الأراضي المفتوحة والحقول المألوفة بالنباتات الأخرى وفي الترب الرملية و قيعان الأنهار كما تشغل بعض الأنواع البيئات المائية الدائمة و

المواطن المطلة على البحيرات كما أن مجتمعات للنوعين *P.aquatica* و *P.coerulescens* تخضع و بصورة دائمية للفيضانات الموسمية [4].

و يضم الجنس *Phalaris* النوع العالمي *P.arundinacea* و الذي أصبح من الأنواع التي تغزو القارة الأمريكية الشمالية و في وقتنا الحالي يستعمل هذا النوع كنوع نموذجي في الدراسات التوسعية للنباتات أو في دراسة النباتات التي تغزو الأماكن [5].

ذكر [6] أن الجنس *Phalaris* ينضوي تحت العشيرة الشوفانية التقليدية Avenea كما وضع ضمن النسب الأولي للعشيرة الشوفانية Avenea اعتمادا على الدراسة التطورية الجزيئية للعويئلة Pooideae التي قدمها [7].

أشترك الجنس *Phalaris* مع الجنسين *Anthoxanthum* و *Hierochloe* بامتلاكهما تراكيب سنيبلية متميزة و عودتهما إلى مرتبة تحت العشيرة Phalaridine من العشيرة الشوفانية Aveneae [8]. كما أستعاد الجنس *Phalaris* مع الجنسين السالفي الذكر وليوضع ضمن كلاد رئيس واحد اعتماداً على التحليل التطوري للبيانات البلاستيدات الخضراء Chloroplast restriction و الصفات المظهرية Morphological characters.

وظهر الجنس *Phalaris* متمثلاً بكلاد رئيس مفرد واحد و أعتبر الكلاد الاخت للجنسين السالفي الذكر في الدراسة التطورية المعتمدة على تتابع الDNA التي أعدها [9] .

وفيما يخص عدد أنواع الجنس عالمياً فقد ميز [10] في أسبانيا أربع أنواع و قطاعين الأول: .sect *Baldingera*(Gaertn.) Paunero و الذي يضم النوع,*P.arundinacea* و القطاع sect. *Euphalaris* والذي يضم الأنواع المتبقية الثلاثة .

أما [11] فقد ميز 15 نوعاً للجنس و سجل [4] و [12] 22 نوعاً للجنس متضمنة النوع المهجن اصطناعياً *P. daviesii* S.T. Blake كما واقترحت دراسات لتصنيف مرتبة تحت الجنس للجنس *Phalaris* إذ رقي النوع *P. arundinacea* إلى مستوى مرتبة الجنس *Phalaroides* Wolf بالاعتماد على دراسة الخصائص المظهرية التي قدمها [13]و [14] .

أن كل الدراسات التصنيفية السالفة الذكر اعتبرت دراسات حدسية لاعتمادها الكلي على الصفات أو الخصائص المظهرية بينما بقيت الدراسات التطورية المعتمدة على المعلومات الجزيئية و التركيبية نادرة أو قليلة جداً .

و فيما يخص الدراسات الجزيئية للجنس فقد حلل [15] مؤشرات تباين أطوال قطع ال DNA المتضاعفة Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP) و بيانات تتابع البلاستيدات الخضراء للنوع *P.arundinacea* و أشار إلى وجود تنوع جيني كبير في نباتات القارة الأوربية مقارنة بالتنوع المحدود لنباتات شمال شرق أوربا .

و أجرت [16] دراسة تطورية جغرافية للجنس مستعملة تتابعات المنطقة النووية ITS بالإضافة إلى تتابع جين البلاستيدات الخضراء *TRN*T-F وتوصلت إلى فرضيات حول أصل وتطور الجنس في منطقة البحر الأبيض المتوسط و أدركت أنماط الانتشار السلفية ومسالك الانتشار التي أدت إلى التوسع الكبير الحديث لأنواع الجنس .

وبالنسبة للعراق فيعد الجنس من الأجناس القليلة الأنواع فقد ذكر [17] في موسوعة النباتات العراقية و [18] و[19] إلى وجود أربعة أنواع وضربان منتشرة في إرجاءه المختلفة .

ومما تقدم فان البحث الحالي يهدف إلى تحديد الأنماط الوراثية عن طريق دراسة التتابعات النيوكليوتيدية Sequences لجين البلاستيدات الخضراء (*mat*K) لأنواع الجنس *Phalaris* المنتشرة في العراق كمحاولة لتوضيح العلاقات التطورية فيما بينها وبأعتماد تفاعل البلمرة الرايبي (PCR).

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسة الجزيئية للجنس *Phalaris* في العراق الأنواع الخمسة *P.arundinacea* و *p.paradoxa* و *P.coerulescens*و *P. brachysta* و *P. minor* و اعتمدت الدراسة على العينات المعشبية الجافة المشخصة والمودعة في المعشب الوطني العراقي (BAG) .

أولاً: استخلاص أل DNA

تم استخلاص مجموع ال DNA الخلوي من الأوراق المعشبية الجافة للأنواع الخمسة اعتمادا على طريقة [20] لاستخلاص الDNA و كالآتي :-

1- أضيفت مادة *B*- Mercaptoethanol (BME) الى مادة CTAB بنسبة 1 مل من CTAB الى 1 مايكروليتر من *B*- Mercaptoethanol (BME) في الهود Hood لكون مادة BME لها رائحة كريهة .
2- انتخبت الأوراق من العينات المعشبية وقطعت الى قطع صغيرة جداً ووضعت في هاون خزفي Mortar ثم سحقت العينات مع أضافه النتروجين السائل الى حين تحويلها الى مسحوق ناعم .
3- بعد طحن الأوراق وتحولها الى مسحوق ناعم أضيف لها 300 مايكروليتر من مادة (CTAB + BME) الممزوجة بالخطوة رقم 1 ويتم مزج المادة مع الأوراق النباتية المطحونة ثم تنقل الى أنبوبة بندروف معلمة سعة 1.5 مل بواسطة ملعقة صغيرة ومعقمة .
4- وضعت العينات في الحمام المائي على درجة 60 درجة مئوية لمدة (30) دقيقة ، مع الهز بصورة خفيفة كل خمس دقائق ويجب التأكد من أن مزيج الـــ (CTAB + BME) يلامس كل المادة النباتية المسحوقة .
5- وضعت العينات بعد استخراجها من الحمام المائي بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين وبسرعة 14000 دورة بالدقيقة حيث تتكون طبقتان تنقل الطبقة العليا الى أنبوبة جديدة في حين تتلف الطبقة السفلى .

6- أضيفت 300 مايكروليتر من الكلوروفورم في الهود Hood الى الأنبوبة المحتوية على الطبقة العليا ويتم هزها حتى تخلط بصورة جيدة.
7- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين وبسرعة 14000 دورة بالدقيقة ، حيث ستتكون طبقتان تنقل العليا الى أنبوبة جديدة معلمة وفي حالة لم تظهر الطبقة العليا النظيفة تعاد خطوة الغسل بالكلوروفورم .
8- أضيفت 400 مايكروليتر من مادة Isopropanol بتركيز 100% المحفوظ في الثلاجة بدرجة (20-) الى الأنبوبة .
9- وضعت الأنابيب في الثلاجة لليوم الآتي ليترسب الـ DNA .
10- في اليوم الثاني تستخرج الأنابيب من الثلاجة وتوضع بجهاز الطرد المركزي لمدة خمس دقائق وبسرعة بسرعة 14000 دورة بالدقيقة حتى يتم ترسيب ال DNA في قعر الأنبوبة وتساعد هذه الخطوة أيضاً على تجمع ال DNA بسهولة من قعر الأنبوبة .
11- يسكب السائل وأضيف (0.5) مل من الايثانول البارد بتركيز(80%) المحفوظ بالثلاجة ، وتدور الأنبوبة يدوياً ببطء وبزاوية مائلة حيث يقوم الايثانول بغسل جوانب الأنبوبة .
12- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتان وبسرعة 14000 دورة بالدقيقة ثم سكب السائل بعدها ، و مسحت فوهة الأنبوبة بواسطة نسيج خاص Chem wipe ، بالإضافة الى سحب السائل من قعر الأنبوبة بواسطة ماصة دقيقة مع التأكد من عدم مس ال DNA الموجود في قعر الأنبوبة .
13- وضعت الأنابيب بصورة أفقية على نسيج Chem wipe لمدة (10-20) دقيقة حتى تم التخلص من الأيثانول الموجود في الأنبوبة .
14- بعد التأكد من تبخر الايثانول من الأنبوبة يتم أضافه (25) مايكروليتر من مادة (TE Buffer) ويحفظ ال DNA المستخلص النقي في الثلاجة تحت درجة (20-) الى حين الاستعمال.

ثانياً: الكشف عن ال DNA المستخلص

1- كشف عن الــ DNA المستخلص بطريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis وذلك بخلط 3 مايكروليتر من الــDNA المراد الكشف عنه مع 2 مايكروليتر من صبغة Loading Dye مع 5 مايكروليتر من محلول TAE تركيز(1X) في قالب يحتوي على حفر خاصة للخلط ، ثم نقل خليط كل عينة بواسطة الماصة الى حفرة من الحفر التي تم صنعها على لوح هلام الاكاروز بعد رفع المشط عنه ، مع مراعاة ترك حفرة فارغة على كل جانب وملى الحفرة الأخيرة بـ(5) مايكروليتر من ال Ladder.
2- وضع قالب الاكاروز في جهاز الترحيل الكهربائي الأفقي وغمر بمحلول TAE تركيز(1X) بحيث يكون ال DNA المراد الكشف عنه من جهة القطب السالب وتكون النهاية البعيدة للحفر باتجاه القطب الموجب.
3- شغل جهاز الترحيل الكهربائي بفولتية 80 فولت لمدة (20) دقيقة وترك لسريان صبغة التحميل DNA Loading Dye من الحفر الى الجانب الأخر.
4- فحص هلام الأكاروز بواسطة الأشعة الفوق البنفسجية حيث ظهرت حزم الDNA بلون برتقالي وصورت بالكاميرا الرقمية .
5- حددت العينيات التي استخلص الDNA منها بنجاح وأعيد استخلاص العينات التي لم ينجح استخلاصها في المرة الأولى ، غلفت الأنابيب الحاوية على DNA بشريط البارافين جيداً وحفظت في الثلاجة الى حين الاستعمال .

ثالثاً: تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

استعملت تقانة PCR لتضخيم جين البلاستيدات الخضراء *Mat*K باستعمال البادئات 7B وMG1 و المجهزة من شركة (IDT) الأمريكية ، والموضح تسلسل وأعداد قواعدها في الجدول (1) حيث يتم تحضير خليط التفاعل (Master Mix) المكون من(12.3) مايكروليتر من الماء ثنائي التقطير ddH2O و(2.5) مايكروليتر من Thermopol و(2) مايكروليتر من MgCl2 و(4) مايكروليتر من DNTPS و (1) ميكروليتر من البادى 7Bو MG1 وبوجود الأنزيم DNA polymerase الذي يسمى Taq بتركيز(0.2) مايكروليتر ، مزج خليط التفاعل جيداً بوضع الأنابيب في جهاز المازج الكهربائي Vortex ، ثم وضع في جهاز ال PCR- Thermal Cycler ، لإتمام تفاعل البلمرة تبعاً للخطوات أدناه في الجدول(2).

جدول (1) تسلسل القواعد النتروجينية لكل بادئ وأعداد قواعدها

Primer البادئات	Sequences تسلسل القواعد النتروجينية (5' ⟶ 3')	طول البادئة (base)
7B	5'-GGATCGGGGCATCCTATT-3	18-MER
MG1	5'-GACTCGAACCCGGAACTAG-3	19-MER

جدول (2) مراحل الدورات الحرارية لتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل لأنواع الجنس *Phalaris* للجين *Mat*K .

Stage	Temperature(C°)	Time (Sec)
Initial denaturation	94 C°	120
No.of Cycles 39		
Denaturation	94 C°	120
Annealing	52 C°	60
Extension	72 C°	90
Final extension	72 C°	180

رابعاً: تنقية الDNA المضخم بجهاز الPCR من هلام الاكاروز

استعملت عدة التشخيص الجاهزة (Kits) المجهزة من شركة Promega الأمريكية لتنقية الDNA المضخم بتفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبحسب التعليمات المرفقة بالنشرة الداخلية للعدة (Kits)

1- وزنت أنبوبة فارغة سعة (1.5) مل وكتب وزنها عليها يوضع فيها الـــDNA المقطوع تحت الأشعة الفوق البنفسجية الناتج من تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، حيث طرح وزن الأنبوبة وهي مملوءة بالـ DNA من وزن الأنبوبة وهي فارغة لاستخراج وزن أل DNA مع هلام الاكاروز الحقيقي .

2- ضرب الرقم الناتج من عملية الطرح X 100 ليتم أضافه مادة Membrane Binding Solution .

3- مزج بواسطة المازج الكهربائي Vortex ووضعت في حمام مائي بدرجة 60 درجة مئوية لمدة 10 دقائق مع مراعاة رجها كل خمس دقائق.

4- وضع العمود SV Minicolumn في أنبوبة الجمع Collection Tube .

5- نقل خليط الجل الذائب بعد استخراجه من الحمام المائي الى العمود وأنبوبة الجمع بواسطة الماصة مع التحضين في جو المختبر لمدة دقيقة واحدة .

6- وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 14000 دورة بالدقيقة ثم يسكب السائل المرشح في أنبوبة الجمع Collection Tube و يعاد العمود الى أنبوبة الجمع مرة أخرى.

7- غسل العمود بإضافة (700) مايكروليتر من محلول Membrane Wash Solution ، ثم وضع بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبالسرعة نفسها ، بعدها فرغت أنبوبة الجمع ويرجع العمود اليها ، وكررت عملية الغسل بإضافة (500) مايكروليتر من محلول Membrane Wash Solution ثم توضع بجهاز الطرد المركزي لمدة خمس دقائق وبالسرعة نفسها السابقة مع تجنب عدم لمس العمود ومن دون تحضين .

8- أستخرج العمود وأنبوبة الجمع من جهاز الطرد المركزي حيث يتم سكب السائل من أنبوبة الجمع وإرجاع العمود لها ثم توضع مرة ثانية بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة على السرعة نفسها .

9- نقل العمود الى أنبوبة جديدة سعة (1.5) مل ويضاف 30 مايكروليتر من مادة Nuclease – Free Water مباشرة الى العمود مع مراعاة عدم تماس الغشاء بطرف الماصة وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة ثم توضع بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبالسرعة نفسها .

10- يتلف العمود وتحفظ الأنبوبة المحتوية على آل DNA المنقى من هلام الجل في الثلاجة بدرجة (-20) لحين الاستعمال.

خامساً : الكشف عن وجود الــDNA المنقى من هلام الاكاروز بواسطة الترحيل الكهربائي

تم الكشف عن نواتج تضخيم الDNA المنقاة من مادة هلام الاكاروز بواسطة ترحيلها كهربائياً حيث يتم مزج 5 مايكروليتر من محلول TAE مع 2 مايكروليتر من صبغة الــ Loading Dye و3 مايكروليتر من آلDNA المنقى المراد الكشف عنه وبخطوات الترحيل السابقة نفسها ولمدة 20 دقيقة ، ثم تكشف تحت الأشعة الفوق البنفسجية للتأكد من وجود الDNA المنقى ، ويتم استعمال الDNA في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لمعرفة تتابع المنطقة المطلوبة حيث يتم تحضير خليط التفاعل Master Mix لتضخيم منطقة ال ITS1 والجين *TRN*LF المتكون من حجم ثابت من صبغة الBig Dye التي تحتوي على جميع مكونات الــــMaster Mix مثل Taq وMgCl2 وThermopol المحفوظة في التجميد تحت درجة (82-) درجة مئوية والبادئ بتركيز 1 مايكروليتر مع التلاعب بكمية الDNA المنقى والماء الثنائي التقطير ddH2O واعتماداً على تركيز الDNA المنقى والمرحل كهربائياً وشدة بريق الحزم تحت الأشعة الفوق البنفسجية يحدد تركيز الDNA الذي يستعمل في التفاعل فإذا كان بريق الحزم عالي يستعمل تركيز واطئ من الDNA مقابل زيادة الماء الثنائي التقطيرddH2O ويجب أن لا يزيد مجمل خليط التفاعل 15 مايكروليتر ، يمزج الخليط بواسطة المازج الكهربائي Vortex وتوضع بجهاز الPCR لإتمام تفاعل البلمرة المتسلسل ، وبعد انتهاء التفاعل تستخرج من جهاز الPCR و توضع في أنابيب خاصة وترسل الى مركز معرفة التتابعات National Science and Technology Development Agency في تايلند.

سادساً:تحليل بيانات التتابعات لمعرفة العلاقات التطورية ورسم الشجرة الوراثية لأنواع الجنس *Phalaris* المدروسة.

بعد وصول النتائج من مركز National Science and Technology Development Agency تفتح بواسطة برنامج Bio Editor الذي يوضح تركيز و جودة القواعد النيوكليوتيدية ، حيث تجري عليها بعض التعديلات بالنسبة للقواعد ، ثم تنقل البيانات الى برنامج Quick Align ليتم تصفيف القواعد (أي وضع كل قاعدة بما يقابلها) مع ترك فراغات بالنسبة للطفرات ثم تحفظ للبدء بتحليلها بواسطة البرنامج Bayesian Analysis مباشرة في الكمبيوتر لرسم الشجرة الوراثية ، وحدد النوع *Anthoxanthum monticola* كمجموعة خارجية Out group لأنواع الجنس *Phalaris* اعتمادا على نتائج الدراسة التي توصلت اليها [21] التي أشارت الى وجود علاقة وثيقة بين أنواع الجنس *Phalaris* و النوع *Anthoxanthum monticola* .

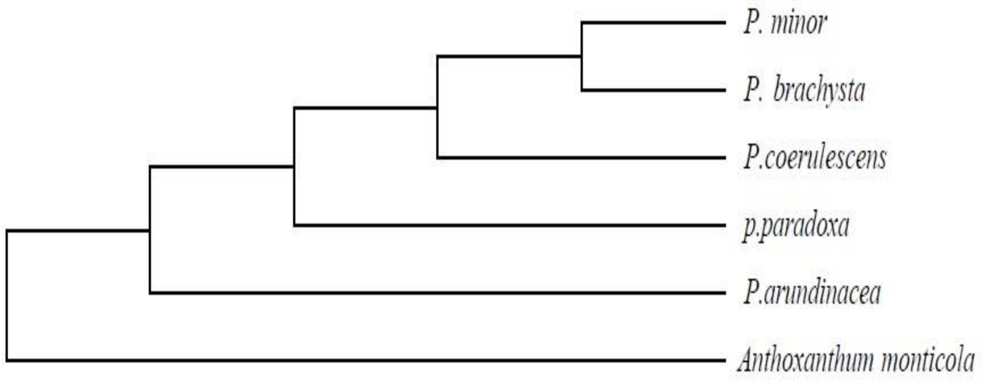
النتائج و المناقشة :

شهد علم البايلوجي الجزيئي (Molecular Biology) في الآونة الأخيرة تطوراً سريعاً حيث تعد مؤشرات تتابع ألدنا DNA Sequences من الطرق الحديثة المثالية و المعتمدة من أجل التمييز بين الكائنات الحية المرتبطة مع بعضها البعض بشكل وثيق ، فضلا عن ذلك فأن استخدام المؤشرات التي تعتمد على ال DNA أحدث حالة مقارنة فعالة وذلك لكون الاختلافات الجينية قابلة للتتبع و التحقيق في كل مراحل تطور الكائن الحي كما أتسمت هذه المؤشرات بعدم تأثرها بالشكل المظهري للنبات و الحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً [22] .

واستعملت عملية التوصل الى معرفة تتابعات الــ DNA لجين أو منطقة معينة سواء في البلاستيدات الخضراء أو النواة أو المايتوكوندريا لتتبع و أيجاد العلاقات التطورية الوراثية الجزيئية Phylogenies في أنواع نباتية تعود إلى عائلات مختلفة و على وجه الخصوص استعمال جينات البلاستيدات الخضراء متفقاً في ذلك مع [23].

وتم دراسة تتابع جين البلاستيدات الخضراء *Mat*K والحصول على مخطط شجري للقرابة الوراثية Dendrogram بين الأنواع الخمس للجنس *Phalaris* في العراق ، و اختير جين البلاستيدات الخضراء *Mat*K من بين بقية الجينات لأهميته في الدراسات التصنيفية والتطورية الحديثة للنجيليات متفقا في ذلك مع [24] الذي أختار هذا الجين من بين 20 جيناً وأستعملوها في الدراسات التصنيفية الجزيئية. وإذا تتبعنا الشكل(1-1) الذي يبين التحليل العنقودي بواسطة برنامج Bayesian analysis مكونات الشجرة الوراثية نجد بأن النوع *P.arundinacea* قد أنحدر بكلاد منفرد في قاعدة الشجرة الوراثية وليتآخى فيه مع كلاد النوع *P. paradoxa* ، فيما كانت الأنواع *P.coerulescens* و *P.brachysta* و *P.minor* ضمن كلاد رئيس واحد توزعت فيه الأنواع الثلاثة ضمن كلادات ثانوية و التي جاء فيها النوع *P.coerulescens* بكلاد مفرد واحد في قاعدة الكلاد الرئيس و الذي تآخى فيه مع الكلاد الثانوي الضام للنوعان *P.brachysta* و *P.minor*. أن ظهور الشجرة الوراثية ذات الطوبولوجية بالشكل الموضح يعد مؤشراً إيجابيا على كفاءة تتابعات جين *MatK* المستعملة في الدراسة كونها الأكثر فعالية في فصل و تشخيص النباتات قيد الدراسة ، إذ تبين من خلال النتائج قدرة هذه التتابعات على تقدير حجم التغايرات على المستوى الجزيئي وتوزيعهما من خلال المواقع الجيني المدروس مما يعكس واقعية هذه التتابعات و شموليتها لكل مناطق المادة الوراثية للكائن الحي متفقاً في ذلك مع [25].

ويلاحظ كذلك وقوع جميع الأنواع العائدة للجنس قيد الدراسة في مجموعة رئيسة واحدة عند استعمال المؤشرات الجزيئية وهذا يؤكد من انحدارها من أصل عرقي واحد Monophyletic وتأثير ذلك على التشابه المظهري الذي تتميز به غالبية نباتات العائلة النجيلية متفقاً في ذلك مع ما توصلت إليه [16] التي أكدت على الانحدار السلفي الواحد لـــ 21 نوع من أنواع الجنس *Phalaris* منتشرة في مناطق مختلفة من العالم على الرغم من أعطائها أنماطا وراثية مختلفة .



شكل (1) المخطط الشجيري الوراثي لأنواع الجنس *Phalaris* للجين*Mat*K باستخدام برنامج التحليلBayesian analysis

Reference

[1] Brooks, T.M, Bakarr M.I, Boucher T. (2004). Coverage provided by the global protected-area system: Is it enough BioScience, 54, 1081–1091.

[2] Hilu ,K.W. (2006). Skewed distribution of species number in grass genera: is it a taxonomic artifact? In: Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics Of Species Rich Taxa (eds Hodkinson T & Parnell JAN), pp. 165–176. CRC Press, Boca Raton.

[3] FAOSTAT. (1999) . Data base on line, http //: apps.Fao.org.

[4] Baldini, R.M. (1995). Revision of the genus *Phalaris* L. (Gramineae).Webbia 49: 265–329.

[5] Thomsen, M. , Brownell. K., Groshek, M., Kirsch, E. (2012). Control of Reed Canarygrass promotes wetland herb and tree seedling establishment in an upper Mississippi River floodplain forest. Wetlands, 32, 543–555.

[6] Clayton, W.D. & Renvoize, S.A.(1986). Genera Graminum: Grasses of the World. London: HMSO.

[7] Schneider ,J., Doring , E., Hilu, K.W, Roser, M. (2009) Phylogenetic structure of the grass subfamily Pooideae based on comparison of plastid matK gene-3′trnK exon and nuclear ITS sequences. Taxon, 58, 405–424.

[8] Soreng, R.J., Peterson, P.M., Davidse, G., Judziewicz, E.J., Zuloaga, F.O., Filgueiras, T.S. & Morrone, O. (eds.). (2003). Catalogue of New World grasses (Poaceae) IV: Subfamily Pooideae. Washington,D.C.: National Museum of Natural History.

[9] Quintanar, A., Castroviejo, S., Catal_an, P. (2007). Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid *trn*T-F and nuclear ITS sequences. American Journal of Botany,94,1554-1569.

[10] Paunero, R.E. (1948). Revisión de las especies españolas del género Phalaris. Anales Jard. Bot. Madrid 8: 475–522.

[11] Anderson, D.H. (1961). Taxonomy and distribution of the genus *Phalaris*. Iowa State Journal of Science, 36, 1–96.

[12] Kodela, P.G, Weiller, C.M, Thompson, I.R .(2009). Phalaris. In: Flora of Australia, vol. 44A (ed. Wilson A), pp. 145–152. ABRS/ CSIRO, Canberra.

[13] Rauschert, S. (1969). Zur Nomenklatur der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands (II). Feddes Repert. 79: 409–421.

[14] Valdés, B. & Scholz, H.(2006). The Euro+Med treatment of Gramineae— a generic synopsis and some new names. Willdenowia
36: 657–669.
[15] Casler, M.D., Phillips, M. & Krohn, A.L. (2009). DNA polymorphisms reveal geographic races of reed canarygrass. Crop Sci. 49: 2139–2148.
[16] Voshell,S.M. & Hilu,K.W.(2014). Canary Grasses (*Phalaris*, Poaceae): biogeography, molecular dating and the role of floret structure in dispersal. Molecular Ecology (2014) 23, 212–224.
[17] Bor, N. L. (1968) . Gramineae. In Townsend C. C. and E. Guest. Flora of Iraq. Ministry of Agriculture. Vol.9. pp, : 172-265.
[18] Chakravarty, H. L. (1976) Plant Wealth of Iraq. S. N. guharay, at saraswaty press Ltd. India .1: 285-294.
[19] Ridda, T.h. J. and Daood, W. H. (1982) . Geographical Distribution of Wild Vascular Plant of Iraq. Nationl Herbarium of Iraq. pp : 115-127.
[20] Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of Plant DNA from fresh tissue . Focus, 12:13-25.
[21] Voshell,S.M. , Baldini, M. , Kumar, M. Nicholas,T, Hilu,K.(2011). Canary grasses (*Phalaris*, Poaceae): Molecular phylogenetics,polyploidy and floret evolution. TAXON 60 (5) .1306–1316.
[22] Baumung ,R;H.Simianer and I.Hoffman.(2004). Genetic diversity studies in farm animals-a surveyJ.Anim.Breed.Genet.,121:361-373.
[23] Clegg, M.T., Gaut, B.S., Learn, G.H., and Morton, B.R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 6795-6801.
[24] Olmstead, R.G., & Palmer, J.D. (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. Am. J. Bot. 81: 1205-1224.
[25] Liang ,H. & Hilu,K. (1996). Application of the *mat*K gene sequences to gass systematics . Can. J. Bot. 74: 125-134.