التشخيص الجزيئي لنوعين من نباتات جنس *Euphorbia* الناميين في محافظة نينوى

[1] د.جهان يحيى الحاتم و [2] د.ايناس رافع قاسم و [3] د.لبنى ياسين عباس
[1][2][3] العراق /الموصل /جامعة الموصل/ كلية التربية للبنات /قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة المؤشر الوراثي الجزيئي للنوعين المدروسين باستعمال تقنية (RAPD) التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا، إذ تم مكاثرة قطع الـ DNA وتضمينها من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل ، وأظهرت النتائج مناظرة القواعد النتروجينية المثبت في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية GraphicsGen Bank باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من النوعين المدروسين باستخدام زوج البوادئ ITs_1 وITs_4 ، لوحظ تطابق تسلسل النيوكليوتيدات مع العزلة العالمية ،اذ بلغت نسبة التطابق للنوع E. helioscopia 99% مع العزلة العالمية المودعة في بنك الجينات ودخلت تحت رقم انضمام ON 989202 وكذلك بالنسبة للنوع و *E. peplus* اذ بلغت نسبة التطابق 99% مع العزلة العالمية المودعة في بنك الجينات و تحت رقم انضمام ON989203.

Molecular Diagnosis Of Two Species Of Euphorbia Genus Plants In Nineveh Province

[1] Jihan Yahya Al-Hatem ، [2] Enas Rafaa Qasim and [3] Lubna Y. Abbass
[1][2] [3] Department of Biology , College of Education for Girls, University of Mosul, Mosul, Iraq
Email[1] : jahan.yahya@uomosul.edu.iq
Email [2] : enas.21gep5@student.uomosul.edu.iq
Email [3] : Lubna.abbdass @uomosul.edu.iq
Correspondence: E-mail: jahan.yahya@uomosul.edu.iq

Abstract

This research examined the molecular genetic index of the two species studied using RAPD technology. Multi-form random multiplication of the DNA chain, as DNA pieces were proliferated and embedded through the chain polymerization reaction, and the results showed the nitrogen rule analogy installed at the National Biotechnology Information Centre Gen Bank Graphics using the chain polymerization reaction (PCR) of the two types studied using the pair of ITs1 and ITs4 starters Neucleotide sequences were observed to be identical to global isolation, with 99 E. with the global isolation deposited in the Gene Bank entering under the entry number ON 989202 as well as the type and E. peplus with 99% with the global isolation deposited in the Gene Bank under accession number ON989203.

1. المقدمة

تعد دراسة الانواع النباتية البرية التي تنمو في بيئتنا مهمة في المحافظة على التنوع الحيوي واستمراريته وان هذا الامر مهم جدا بالنسبة للسكان المحلين لأنه ينتج جزءا من غذائهم ودوائهم العشبي-Al Hatem (2018)، وقد احتلت النباتات الطبية اهمية كبيرة في مجال البحث العلمي . تعد العائلة السوسبية

Euphorbiaceae من العائلات الكبيرة التي تضم 313جنسا موزعه على 8100 نوعا منتشرة في مختلف دول العالم، و لها في العراق 45 نوعا بريا و7 أنواع منزرعة، وان جنس Euphorbia هو اكبر اجناس العائلة السوسبية Euphorbiaceae والذي يعد ثاني اكبر جنس من النباتات الزهرية وهو جنس عالمي الانتشار يضم حوالي 2150 نوعا (Mabberley,2008 ، 2022؛ Dalia and Al Qahtani)، وهي اعشاب قائمة، لونها اخضر فاتح ارتفاعها (20-30) سم، ينقسم الجذع الرئيس الى فروع كل فرع ينقسم (3-5) افرع ثانوية ، الأوراق متبادلة في الجزء السفلي بينما الأوراق العلوية متقابلة والأوراق التي تقع اسفل الافرع الشعاعية والتي تترتب بشكل سواري مكونة ما يسمى بالخيمة الكاذبة، النورة في هذا الجنس تسمى سيتونة (Cyathium) وهي نورة محدودة النمو، فيها الزهرة الرئيسية انثوية وتكون متدلية ويوجد تحتها (4-5) قنابات ملتحمة مع بعضها لتشكل ما يشبه كؤيس يسمى قناب(involucer) ويوجد في ابط القنابات(3-5) ازهار مذكره. وتنمو نباتات هذا الجنس في مختلف المناطق الجافة وشبه الجافة والمناطق المدارية وشبه الاستوائية.

اسهمت الدراسات الجزيئية Molecular studies في حل معظم المشاكل التصنيفية وإعادة تصنيف الكثير من العائلات النباتية ووضعها في مواقعها التصنيفي الصحيح، وتمكن الباحثون الذين عزلوا المادة الوراثية للنباتات من ايجاد العلاقة التطورية بين النباتات عبر الزمن (Al- Annaz and Al-Hatim 2023,)، وتعرف المهتمين بالتاريخ التطوري للنباتات على الاختلافات التي طرأت عليها في الماضي والحاضر، فضلا عن ذلك تم الكشف عن هوية الكثير من النباتات واعادة توصيفها. بين Mohamed *et al.*,2016) ان الخلية النباتية تقوم بمضاعفة كمية الحمض النووي عند انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ، و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و هي تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط، ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي ، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، خارج النظام الحيوي (الخلية)، ووجد من خلال البحوث ان تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) هو عبارة عن تضخيم جزيئة واحدة أو بضع نسخ من قطعة من الحمض النووي عبر عدة أوامر، لتوليد آلاف الملايين من النسخ من تسلسل الحمض النووي بصفة خاصة، وهي تقنية لا يمكن الغنى عنها في كثير من الأحيان تستخدم في مختبرات البحوث مجموعة متنوعة من التطبيقات، ان الهدف من استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) هو لتضخيم عدد نسخ الجين للوصول الى عدد معين من النسخ لاستعماله كقالب لتكثير وتضاعف DNA . تبين من خلال البحوث ان العائلة السوسبية تعاني مشاكل تصنيفية وذلك لانتشار افراد هذه العائلة الواسع، فهي منتشرة في كل بقاع الارض، إذ يلحظ تكيفها لمقاومة الظروف البيئة المختلفة فقام الباحثون بتحديد القرابة الوراثية بين هذه الانواع المتباينة مظهرياً وايجاد الهوية الوراثية لمعظم افرادها. بين (Sulaiman etal., 2020) ان العدد الكروموسومي لكلا من *E. helioscopia* و *E. peplus* (7.8، 21) على التوالي.

الهدف من البحث: يهدف البحث الى تشخيص النوعين البريين *E. helioscopia* و *E. peplus* باستخدام تقانة (RAPD-PCR) لمعرفة اوجه التشابه والاختلاف الوراثي بينهما.

2. المواد وطرائق العمل

جمعت العينات الورقية من النوعين المدروسين خلال شهر ايلول وأخذت العينات المدروسة من النموات الورقية الحديثة النمو وبعمر (3-4) أسابيع والخالية من الاصابات المرضية والحشرية، وتم عزل الـ DNA الجيني، وتم تنفيذ هذه الدراسة في مختبرات التقنيات الاحيائية في شركه جسر المسيب /بغداد /العراق.

تم في هذا المحور اعتماد طرق التوصيف والتشخيص الجزيئي بالاعتماد على الحمض النووي DNA للنوعين المدروسين *E. helioscopia* و *E. peplus* لأجل تصنيفهما، وللتأكيد على التشخيص المظهري والتشريحي والكيميائي المدروسين تم توصيف النوعين عن طريق عزل الحامض النووي وتنقيته بالاعتماد على العدة (i- Taq TMDNAPOLY merase) ويشير الجدول (1) الى كمية المواد المقترحة

وتراكيزها المستعملة لتصنيع شريط الحمض النووي، مزجت المواد الموضحة في الجدول (1) ليكون حجمها النهائي 20مايكروليتر في انابيب تفاعل التضخم العكسي Reverse transcriptase لتصنيع الحامض النووي DNA.

الجدول (1): الاحتياجات اللازمة لتصنيع الحمض النووي DNA والمحاليل اللازمة لتحضيره

عدة الاستخلاص	الحجم (ميكروليتر)20 µl
i-TMDNA poly (5u/ul)	2.5 u
dNTPs	2.5 Mm each
Reaction Buffer(10x) (محلول منظم)	1 X
Gel Loading buffer	1 X

2. 1:استخلاص الحامض النووي من النوعين المدروسين *E. helioscopia* و*E. peplus* حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة الكوريه باستعمال الكت: (Favor Prep Fungi /Yeast Genomic DNA Extraction Mini Kit) وكما يلي :

1. اخذه وزن 100 ملغم(وزن طري) من الجزء النباتي ووضع في انبوبة (Eppendorf tube) سعة 1.5مل لغرض سحقها باستعمال النيتروجين السائل.
2. اضيفه 1 مل من FA Buffer ،وثم وضعت بجهاز الطرد المركزي Microcentrifuge عند 5000 دورة لمدة دقيقتين.
3. تم اضافه 550 مايكروليتر من محلول FA Buffer الى العينة في وظيفه 50 مايكروليتر من محلول Lyticase ومزجت جيدا بجهاز Vortex mixer ، ثم وضعت العينات بدرجة حرارة 37مْ لمدة 30 دقيقة، ثم اجري الطرد المركزي لها لمده 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/ دقيقة.
4. تم اضافة 350 مايكروليتر من TGL وخلطت جيدا ، ثم نقل الخليط الىbead tube وخلطت جيدا بواسطة جهاز المزيج vortex mixer
5. اضيف 20 مل من proteiinase وخلط المزيج ووضعت في Incubate في درجة حرارة 55مْ لمده 15 دقيقة ، ثم نقلت الى جهازvortex ومزجت جيدا.
6. اخذ المزيج وضع في جهاز الطرد المركزي Centerfuging على سرعة 5000 دورة/ دقيقة لمده دقيقة واحدة، ونقل 200 مايكروليتر من المادة الطافية الى انبوب جديد micro centerfuging حجم 1.5 مل .
7. اضيف 200 مايكروليتر من TG_1 Buffer ومزج جيدا .
8. اضافة 200 مايكروليتر من كحول الايثانول 100 وخلط جيدا بجهازPulse n- vortexing لمدة 10 ثواني.
9. تم نقل 700 ميكروليتر من المزيج الى مرشح التنقية (Filer column) الموضوع في انبوب 2 مل مع اجزاء الطرد المركزي لمدة دقيقتين بسرعة 14000 دورة / دقيقة ، ثم نقل الراشح بحذر الى انبوبة بندروف 1.5 مايكروليتر.
10. ثم اضافة نسبة 150% من محلول TG_2 Buffer الى الراشح ونقل من المزيج 700 مايكروليتر الى انبوبة GD المثبت في انبوب التجمع مع اجراء الطرد المركزي بسرعة 16000دورة / دقيقة لمدة دقيقتين لينفذ الراشح.
11. يضاف 400 مايكروليتر من محلول الغسل W_1 الى انبوب GD لينفذ الراشح ويعاد الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة.

12. اضافة 750 ميكروليتر محلول الغسل (Wash Buffer) الى TG mini column واجري الطرد المركزي عند 14000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية، أهمل الراشح ثم وضع TG mini column في انبوب تجمع جديد.

13. تم اجراء طرد مركزي للعينة بسرعة 14000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق لتجفيف العمود.

14. تم في المرحلة الاخيرة لعملية استخلاص الحمض النووي نقل المرشح الجاف الي انبوبة البندروف حجم 1.5 مل واضيف 100 مايكروليتر من محلول (TE) Elution buffer في مركز المرشح ونقل الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة / دقيقة لمده 30 ثانية للحصول على الحامض النووي يستخدم لاحقا في خطوات تقنية PCR وحفظ DNA بالتجميد لحين الاستخدام .

15. تم استخدام جهاز المطياف النووي الضوئي للاشعة فوق البنفسجية (UV/UN) Spectrophotometer عند الطول الموجي (260) نانوميتر للتاكد من نقاوة DNA الجينومي للمستخلص من العينات المدروسة باخذ 10 مايكروليتر من الحمض النووي DNA المستخلص ويكمل الحجم الي 2 مل بالمحلول المنظم Elution buffer

2. 2: تقدير الاحجام الجزيئية للدنا (DNA)

قدرت الاحجام الجزيئية للدنا اعتمادا على اجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1.5%، باستخدام دليل حجمي يمثل قطع من الدنا حجمها الجزيئي معلوم متمثلة بالدلائل الحجمية Markers . ان المسافة التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام تناسبت عكسيا مع احجامها الجزيئية وقد استعمل الدليل Sizer DNA Markers (intron) اذ اعطى هذا الدليل في هلام الاكاروز حزم ذات اوزان جزيئية معروفة .

2. 3: المحاليل المستخدمة في الترحيل / طريقة تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي DNA

1. تم تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1.5% بإذابة 1.5غم من مسحوق الاكاروز في100 مل من TBE Buffer 10 x ووضع في دورق حجمي سعته (100) مل ،وتم تسخين الاكاروز لدرجة الغليان لكي يتم ذوبانه بالكامل .
2. ثم يترك الهلام ليبرد الى درجة حرارة (50-55) مْ.
3. سكب الهلام بعدها في حوض التحميل لنحضر لوح الجل الذي ثبت في طرفه المشط لعمل ثقوب خاصة لحمل العينات، ثم سكب الجل برفق حتى لا تكون فقاعات هوائية وترك لمدة 30 دقيقة ليبرد، ثم ازيل المشط بلطف من الاكاروز الصلب.
4. ثبتت بعدها الصفحة على حاملها في الوحدة الافقية ممتثلة بالخزان الذي تم ملؤه بمحلول $TBEx_1$ كي يتم تغطية سطح الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي.

4.2: تحضير العينة:

تم خلط 2 مايكروليتر من صبغة التحميل Red safe staining المحضرة من شركة (Intron/korea) مع 5 ميكروليتر من الحمض النووي النقي لغرض الترحيل كهربائيا ،وبعد عملية الخلط تمت عملية التحميل في فتحات الهلام ،وتم تشغيل جهاز الهجرة الكهربائية Electrophoresis بتيار كهربائي قوة 7 فولت /ثانية لمدة ساعة واحدة لحين وصول الصبغة الى الجهة الثانية من الجل ،اذ ضبطت الاقطاب ليكون اتجاه الترحيل للعينات نحو القطب الموجب مع مرعاة ايقاف الترحيل عند وصول الترحيل للعينات الى قبل نهاية الهلام . تم اختبار الجل باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 336 نانوميتر، يعد وضع الهلام في حوض يحتوي على (5ميكروليتر من محلول صبغة الحامض النووي الحمراء الامنة والمذابة في 500 مل الماء المقطر)، اذ أصبح الحامض النووي مشعا بلون اخضر مشع عند مشاهدتة بجهاز UV. Transminsion.

5.2: البادئات المستخدمة في التفاعل

حفظت البادئات بالتجميد، وتم اذابتها بالماء المقطر منزوع الايونات ddH_2O الحر لاعطاء تركيز قدره 100 بيكومول / ميكرولتير كمحلول مخزون والاحتفاظ بالمخزون عند حرارة -20مْ ، لتحضير محلول تركيزه 10 بيكومول / ميكرولتير كعامل تمهيدي مغلق .سحب 10 ميكرولتير من محلول المخزن واضيف الى 90 ميكرولتير من الماء المنزوع الايونات ddH_2O للوصول الى الحجم النهائي 100 ميكرولتير. تم الاختبار اعتمادا على تعليمات شركة التقنيات الكندية المتكاملة Integrated DNA Technologies Company Canaola(IDT)

62.الكشف عن جينات ITS باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل : Polymerase Chain Reaction (PCR)

تم اجراء الكشف عن منطقة الاستنساخ الداخلي ITS باستخدام PCR مع استخدام زوج البادئات البادئ العام Universel primer لتحديد العزلة النباتية للنوعين اذ تم تضخيم جزء من ITS باستخدام

البادئ الاساسي (ITS1F: 5:TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3\)

والبادئ العكسي (ITS4R :5:TCCTCCGCTTATTGATAGC-3\)

تم اجراء تضخيم PCR بحجم اجمالي قدره 25 ميكرولتير يحتوي على 1.5 ميكرولتير من الحمض النووي و5 ميكرولتير Intron(Pre mix PCR) كوري المنشا ،1ميكرولتير من كل بادئ ثم تم اضافة الماء المقطر الى الانبوب للوصول الى الحجم الكلي من 25 مايكرولتير . اجريت ظروف التدوير الحراري وفق ماجاء به وكما بين في الجدول تم مضاعفة الحامض النووي باستخدام خطوات وظروف تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الانية كما مبينة في الجدول (2)تم عمل مسخ اولي Initial denaturation للحامض النووي (DNA)لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 95 مْ متبوعة ب35 دورة مؤلفة من عملية مسخ نهائي (Denaturation-2) لمدة 45 ثانية في درجة حرارة 95 مْ ، ثم حدوث الارتباط البوادئ (annealing) لمدة 1 ثانية في درجة حرارة 53 مْ ، ومن ثم استطالة اولية لبادئ الناتج الحامض النووي المضاعف لمدة ثانية في درجة حرارة 72مْ ، واخيرا انهاء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بخطوة الاستطالة النهائية خمس ثواني في درجة حرارة 72مْ .

الجدول (2): البرنامج الخاص بالتفاعل المتسلسل التضاعفي المتخصص

No	Phase	Tm (C)	Time	No. of cycle
1-	Initial Denaturation	95C	5 min	1 Cycle
2-	Denaturation -2	95C	45Sec	35 Cycle
3-	Annealing	53C	1 min	
4-	Extension-1	72C	1 min	
5-	Extension-2	72C	5 min	1Cycle

للكشف عن تسلسل القواعد النتروجينية وتعيين المخطط التشجري: (تحليل التتابع النيوكليوتيدي Sequencing Analysis) يعد الحصول على نتائج الترحيل الكهربائي من خلال نتائج تضاعف الجين DNA ،وتم تحديد تتابعات النيوكليوتيدات للعزلة بارسال الحزم الناتجة من ناتج من تفاعل البلمرة المتسلسل الى الشركة الكورية Biotechnology ، وتتم باستخدام جهاز (Appliced Biosystem DNA Secuencer)، وتم مقارنة النتائج من خلال الشبكة العنكبوتية باستخدام اداة البحث Basic (BLAST) Aligmmente Search Tool، اذ تم تحديد تسلسل القواعد النتروجينية لحزم الحمض النووي لمورثات النوعين المدروسين من قبل المركز الوطني لمعلومات التقنات الحيوية (NCBI) National centre for biotechnology information) من خلال الرابط: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi

وتم اجراء التطابق لتتابعات النيوكليوتيدات للنوعين المدروسين حسب التطابق في قاعدة البيانات، بعد الانتهاء من التشخيص تم تسجيل النباتات في البنك الوراثي واعطاء رقم الانضمام العالمي، ثم رسم شجرة التطور Phyiogenetic Tree باستعمال برنامج Mega اعتماد على تسلسل النيوكليوتيدات للعزلات المسجلة في بنك الجينات Gene Bank .

اعتمدت طُرق التوصيف والتشخيص الجزيئي للتأكيد على التشخيص المظهري والتشخيص التشريحي لنبات *Santolina insularis* فتتم توصيف النبات إلى مستوى النوع والسلالة بالاعتماد على تعيين تسلسل القواعد النيتروجينية، واعتمدت طريقة Sanaco و Leong (1989) للعمل وتم حساب تركيز الـDNA الجينومي بالاعتماد على (Freifelder,1983؛ ;Rapley,2000).

3. النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج التشخيص الجزيئي للنوعين المدروسين *E.helioscopia* و*E. Puples* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من خلال استعمال زوج البادئات المتخصصة الكشف عن الجينات في منطقة فاصل النسخ الداخلي Internal transcribed spacer ITs وهي:

البادئ الامامي (ITS_1F: 5:TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

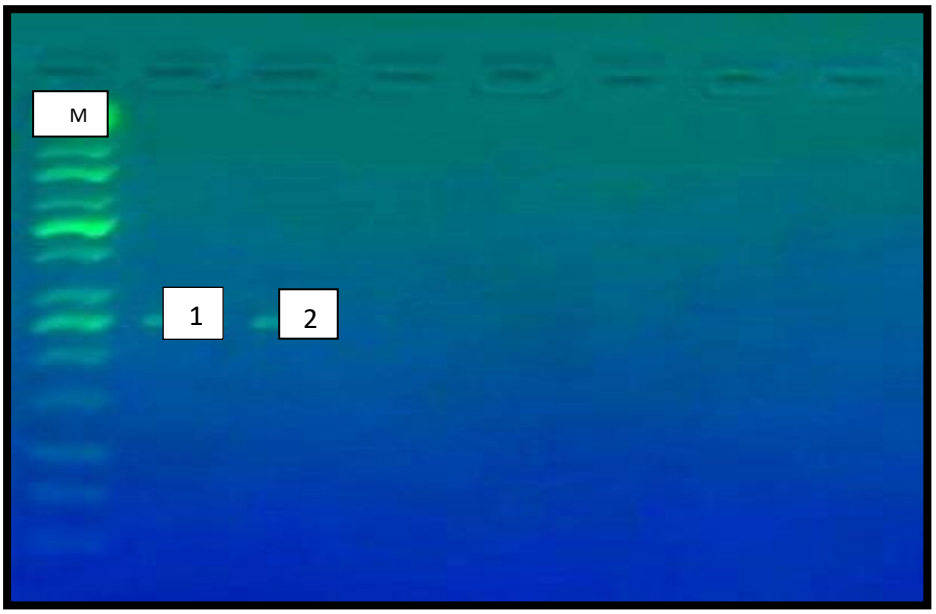
والبادئ العكسي (ITS_4R:5:TCCTCCGCTTATTGATAGC-3')

واظهرت نتائج تحلل الترحيل الكهربائي الشكل (1) باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5%، اذ عرض للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 254 نانوميتر بواسطة UV traslluminator للكشف عن حزم ال DNA كان مطابقا لما جاء في تصميم البادئ المسؤول كمحدد لتضخيم المورثات ITs_1 وITs_4 وظهرت الحزم اثناء الترحيل بحجم 420 زوج قاعدة. يوضح الشكل(1) والجدول(3) ناتج الحمض النووي (600bp–PCRproduct) باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من النوعين المدروسين باستخدام زوج البوادئ ITs_1 وITs_4. علما ان M تمثل سلم الحامض النووي (Molecular – weight size marker) بعدد ازواج القواعد النتروجينية (bp) وباحجام مثبت كل منها على الجانب الايسر من الشكل ،ويمثل المسار (1و2) النتيجة الموجبة لوجود الحزم الممثلة للنوعين المدروسين E.helioscopia و E. Puples ،ويلاحظ من الجدول (5) مطابقة تسلسل النيوكليوتيدات مع العزلة العالمية لتاكيد التشخيص ،اذ بلغت نسبة التطابق للنوع E.helioscopia 99% مع العزلة العالمية المودعة في بنك الجينات ودخلت تحت رقم انضمام ON 989202 وكذلك بالنسبة للنوع E. Puples اذ بلغت نسبة التطابق 100% مع العزلة العالمية المودعة في بنك الجينات و تحت رقم انضمام ON989203.

18S ribosomal RNA gene							
No	**Type of substitution**	**Location**	**Nucleotide**	**Sequence ID with compare**	**Sequence ID with Submissions**	**Source**	**Identities**
1	**Transition**	**233**	**A\G**	**ID: JQ750880.1**	**ID: ON989202.1**	***E. helioscopia***	**99%**
	Transvertion	**304**	**C\G**				
	Transition	**400**	**T\C**				

2	Transition	344	T\C	ID: HQ 900643. 1	ID: ON98920 3.1	*E. peplus*	99%
	Transvertio n	371	G\T				

الجدول (3): التشخيص الجزيئي للنوعين *E. helioscopia* و*E. Puples* اعتمادا على النسبة المئوية لتطابق تتابعات النيوكليوتيدات مع العزلة العالمية في البنك الوراثي العالمي



الشكل (1) :ناتج التضخيم للموروث ITs_1 وITs_4 الحزمة (1و 2) تمثل النتيجة الموجبة عند (زوج قاعدة) للنوعين المدروسين E.helioscopia و E. Puples المقياس الجزيئي 420زوج قاعدي .

ومن الشكل (2) يبين تتابع النيوكلوتيدات لمناطق الاستنساخ الداخلي لنوع *E.helioscopia* ان هناك طفرات حدثت في طفرة بالموقع 238 اذا استبدل ادنين مكان الكوانين وبالموقع 358 اذ استبدل الكوانين بالسايتوسين وبالموقع 418 اذا استبدل الثايمين بالسايتوسين

ومن الشكل (3) يبين تتابع النيوكليوتيدات للنوع *E. Puples* حدثت طفرة بالموقع 370 اذ استبدل الثايمين بالسايتوسين وبالموقع 430 اذ استبدل الكوانين بالثايمين وكانوا جميعا غير مؤثرين على الشفرات الوراثية ثم التعبير الجيني لتشفير النوعين المدروسين :

***Euphorbia helioscopia* voucher Riina, R. 1607 (MICH) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Sequence ID: JQ750880.1Length: 632Number of Matches: 1** Range 1: 59 to 548GenBankGraphics Next MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
871 bits(965)	0.0	487/490(99%)	0/490(0%)	Plus/Plus

Query 1
CCATCGTGGATCCCTCATTGGGGCCTAAACGAGGGAAACGGGAT
CAGGTTATGCCTTTCC 60

Sbjct 59 118

Query 61
CCGCAACCCTTGATCTTGGGCCTCCTAACCAAACCCCGGCGCTA
AACGCGTCAAGGAATT 120

Sbjct 119 178

Query 121
GCAAACGAAAAGATTGCACGCCCTGGTTGCCCCGGAAACGGTGA
GCATCTGGAAGGCGTA 180

Sbjct 179 .....A..... 238

Query 181
GCACTTTTGAGAATCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG
CTCTCGCATCGATGAA 240

Sbjct 239 298

Query 241
GAACGGAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGGATCCCG
CGAACCATCGAGTCTT 300

Sbjct 299 .....C..... 358

Query 301
TGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTTGGCCGAGGGCACGCCT
GCCTGGGTGTCACTCA 360

Sbjct 359 .....T..... 418

Query 361
ATCGTCGCCCCAACTACCTCCCTAATAAGGGACGTGTGCGGGGG
CGGATGCTGGCTTCCC 420

Sbjct 419 478

Query 421
GTGTGCATTGAGCTCGCGGTTGGCCCAAATTCCCGGTCCTTGGT
GGCAGCGCCACGACAA 480

Sbjct 479 538

Query 481 TCGGTGGTTG 490

Sbjct 539 548

الشكل (2): تتابع النيوكليوتيدات لمناطق الاستنساخ الداخلي للنوع *E. helioscopia* للعزلة العالمية المسجلة بالرقم ON989202.1

***Euphorbia peplus* voucher Barres 16 (BC) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence /Sequence ID: HQ900643.1Length: 592Number of Matches: 1** Range 1: 71 to 560GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
875 bits(970)	0.0	488/490(99%)	0/490(0%)	Plus/Plus

Query 1
CTCCCTCCGGGGCCCGGGGGAGACGGCGCGGGAGCTCGCCTGTCGCGCCCCTCGTCCGCG 60

Sbjct 71 130

Query 61
GCCTCGCCTAACAAAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGGAATCGAAAACGAAAAGGTCGC 120

Sbjct 131 190

Query 121
GCTCGACGCGACCCTTGAGAACCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA 180

Sbjct 191 250

Query 181
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGGATCCCGCGAACCAT 240

Sbjct 251 310

Query 241
CGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGT 300

Sbjct 311 .....T..... 370

Query 301
TTCACTCTGTCGTCGccccccTCGCTCCTCCGGGACGCGGGCGGGACGGAAGCTGGCTT 360

Sbjct 371 G..... 430

Query 361
CCCGTGGGCTCGTCCCGCGGTTGGCCCAAATGCCCGGTCCTCGG
CGTCCTCGCCGCGGCA 420

Sbjct 431 490

Query 421
TTCGGTGGTTGAGAAACCCTCGCAAGCCGCCGCGCGCGCAAGGC
CGTCCGAACGGACCGA 480

Sbjct 491 550

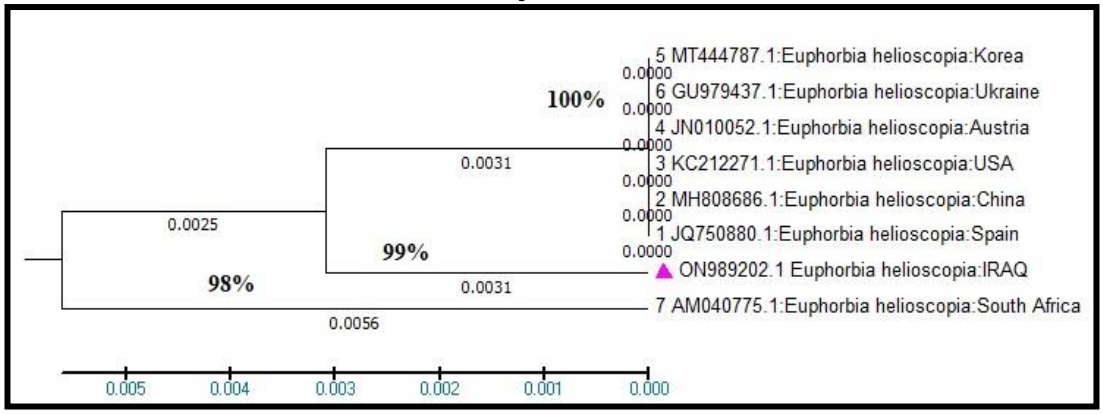
Query 481 CCGGACCCCG 490

Sbjct 551 560

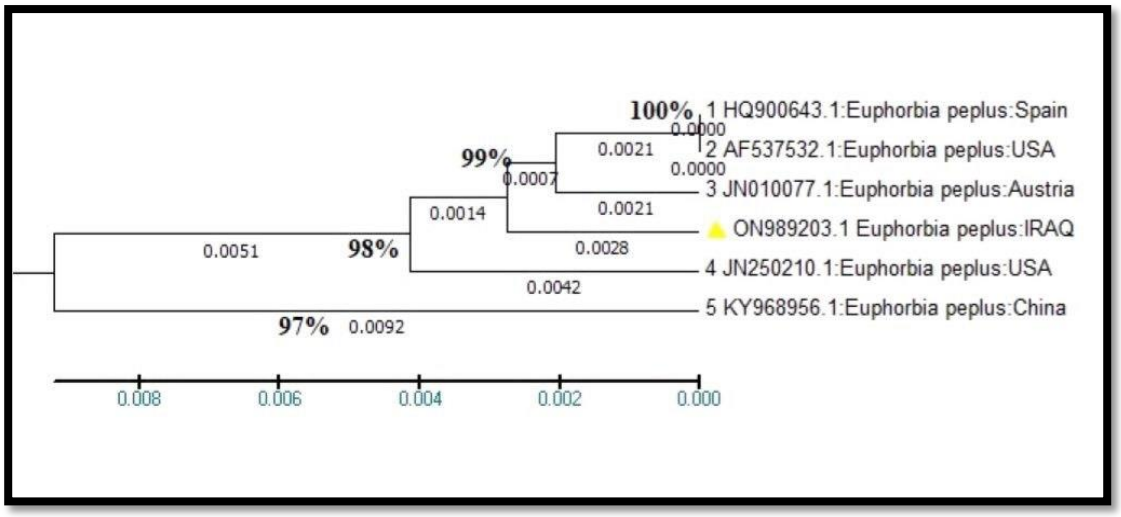
الشكل (3): تتابع النيوكليوتيدات لمناطق الاستنساخ الداخلي للنوع *E. helioscopia* للعزلة العالمية المسجلة بالرقم ON989203.1

اماتحليل الشجرة الوراثية الشكل (4) للنوع *E. helioscopia* نلاحظ مستوى التقارب على المستوى الجيني كان كبيرا بين النوع المدروس (عزلة العراق) والمسجلة بالرقم ID:ON 989202.1 وكان اكثر تقاربا وبنسبة التطابق 100% مع كلا من العزلات الذين كانوا تحت رقم انضمام العزلة الكورية MT 5 444787 والعزلة الأوكرانية 6GU97437.1 الاسترالية4JO750880.1، في حين كانت نسبة التطابق 99%مع كلا من العزلة الامريكية3KC 212271.1 والعزلة الصينة 2MH- 8086861 و العزلة الاسبانية 1JQ750880.1 وبنسبة تطابق 98% مع عزلة جنوب افريقيا.

في حين نلاحظ من الشكل (5) الشجرة الوراثية للنوع *E. Puples* ان التقارب الكبير بين عزلت العراق للنوع الذي درس في هذا البحث والمسجل بالرقم ID:ON989203.1 والأنواع المسجلة في بنك الجينات العالمي NCBI، وان نسبة التطابق كانت 100% مع العزلة الاسبانية ذي الرقم1HQ900643.1 ، في حين كان التطابق 99% مع العزلتين الامريكية AF537532.1 و العزلة الاسترالية4JN010077.1 ،حين بلغت نسبة التطابق 98% مع ونسبة العزلة الامريكية4JN250210.1، وكان التطابق 97 % مع العزلة الصينية4KY968956.1. وهذة النتائج تطابق ما وجده (Williams *et al.*,1990؛ Zokian,2010؛ Aljibouri *et al.*,2016؛ Mohamed *et al.*,201 .



الشكل (4) : مخطط الشجرة الوراثية للنوع E.helioscopia المعتمد من قبل (NCBI)



الشكل (5) :مخطط الشجرة الوراثية للنوع المعتمد *E. Puples* من قبل (NCBI)

المصادر:

Aljibouri, A. A. M., Zokian, S. A. Y., & Almusawi, A. H. (2013). RAPD-PCR analysis of some species of Euphorbia grown in University of Baghdad Campus in Jadiriyah. African Journal of Biotechnology, 12(49), 6809-6816.

Al- Annaz R.A., Al-Hatim J. Y. (2023).The study of some anatomical indicators and molecular genetics of Santolina insularis plant that grows in Iraq. Appl. Biochem. Microbiol. 59(S1): 299-305 https://doi.org/10.5281/zenodo.7605386

Al-Hatem G. Y. Q. (2018). Effect of Nitrogenic Fertilizer and Seaweed Extract (Fitoalg) in some Green Growth and Total Yield on the Plant Coriander, Coriandrum sativum L. Journal Tikrit Univ. For Agri. Sci. Vol. (18) No. (4), ISSN-1813-1646.

Dalia, G. G., & AlQahtani, R. (2022). A Review on: Morphological, Phytochemical and Medical Important of Some Wild Euphorbiaceae Poisonous Plants. Haya Saudi J Life Sci, 7(11), 299-313.

Freifelder, D. (1983). Molecular biology, a comprehensive introduction to prokaryotes and eukaryotes. Seince books Internationol. Van Nostrand Beinhold comp., USA.

Mabberley , D.J. (2008). Mabberley's plant-book (3th ed.). Cambridge

University Press; Cambridge: XVIII .1021 p.

Mohamed, G.I.A. '; A. M. Zaher²; A. A. Ali2; Hanaa M. Saeyd² and Sabrin R. Mohamed²(2016) Authentication of *E. peplus* L. Family Euphorbiaceae Growing in Egypt Using Finger Printing . Genetic Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut-Egypt-,47(5) ,72-82.

Rapley, R (2000). **The Nucleic Acid Hand Book**, Humana, Totowa. NJPP: 1-41.

Sulaiman, S. K., Ismail, Z. A., & Aliwy, S. A. (2020). Study of the cytological and micro-microphologpcal characteristics of some species of the genus *Euphorbia* L. belong

to *Euphorbiaceae* family,using electron microscope in Iraq. The Iraqi Journal of Agricultural Science, 51(5), 1394-1404.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research, 18(22), 6531-6535.

Zokian;S.A.(2011) Biosystematics of four species of Euphorbia l. grown in Baghdad university campus- Jadiriyah . Ph .D Thesis .College of Science;Baghdad University.