ISSN: (3007-0384)
E-ISSN: (3007-0392)
مجلة وهج العلوم للعلوم الصرفة
المجلة متاحة على الرابط
https://uomosul.edu.iq/womeneducation/jwups/

The Molecular Identification of *Hypericum Perforatum* L. Growing in Nineveh Governorate

Daniah A. Shihab[1],
Jihan Y. Al-Hatem[2],
Firas M. B. Alkhashab[3]
[1],[3]Dept. of Biology, College of Education for Women, University of Mosul, Mosul, Iraq.
[2]Dept. of Horticulture and Gardens Engineering, College of Agriculture and Forestry, University of Mosul, Mosul, Iraq
*Corresponding author e-mail: daniah.23gep17@student.uomosul.edu.iq

Keywords:
Hypericum Perforatum,
the molecular identification,
DNA estimation.
ARTICLE INFO
Article history:
Received 2024/11/20
Accepted 2024/12/8
Available online
Email: jwups@uomosul.edu.iq

A B S T R A C T

This research focused on studying the molecular genetic marker of the wild St. John's Wort plant (Hypericum perforatum L.), which was collected in September from Nineveh Governorate (Tal Afar District / Zummar Subdistrict). The studied samples were taken from newly grown leaf tissues aged 3–4 weeks, free from insect and disease infestations. The analysis utilized the Specific-PCR technique, where DNA fragments were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) method and the Favor PrepTM Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit. The results of this study matched the nucleotide sequences recorded in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database for the plant species under investigation. This was achieved by using the primer pair (ITS1F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and (ITS4R:5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3').

After inputting the nucleotide sequences into the NCBI-BLAST tool and the MEGA 6.0 software, the analysis demonstrated a high degree of similarity with the registered genes in the GenBank database. The nucleotide sequences under investigation showed a similarity percentage of 98.57% to 100% with global isolates. The sequences were recorded under the accession numbers PQ395287.1, PQ395288.1, PQ395289.1.

© 2025JWUPS, College of Education for Women, University of Mosul.

Journal of Wahj Al-Ulom for Pure Sciences
Journal of Wahj Al-Ulom for Pure Sciences
Journal of Wahj Al-Ulom for Pure Sciences

التشخيص الجزيئي لنبات حشيشة القلب البري (العرن المثقوب) *Hypericum Perforatum* L. النامي في محافظة نينوى

دانيه عبدالاله شهاب[1]، جهان يحيى الحاتم[2]، فراس محمد بشير الخشاب[3]
[1]، [3] العراق /الموصل /جامعة الموصل/ كلية التربية للبنات / قسم علوم الحياة
[2] كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل/ قسم البستنة وهندسة الحدائق

الخلاصة:

تم في هذا البحث دراسة المؤشر الوراثي الجزيئي لنبات حشيشة القلب البري (نبات العرن المثقوب) *Hypericum Perforatum L.*، والتي جمعت خلال شهر أيلول من محافظة نينوى (قضاء تلعفر/ ناحية زمار)، واخذت العينات المدروسة من النموات الورقية الحديثة النمو وبعمر (3-4) اسابيع التي تكون خالية من الإصابات الحشرية والمرضية، وباستعمال تقنية التفاعل التضاعفي المتخصص *Specific - PCR* اذ تم مكاثرة قطع *DNA* خلال تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال الكت *Favor Prep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit.*، وكانت نتائج الدراسة الحالية مناظرة للقواعد النتروجينية المثبتة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية *Gen Bank Graphics* لنوع النبات قيد الدراسة عن طريق استعمال زوج من البوادئ (*ITS1F:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3*)،(*ITS4R:5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3*).

وبعد ادخال بيانات القواعد النتروجينية في برنامج *NCBI-BLAST* وبرنامج *MEGA 6.0*، لبيان مدى التقارب مع المورثات المسجلة والموجودة في بنك الجينات *Gen Bank*. لوحظ تطابق تسلسل النيوكليوتيدات مع العزلة العالمية وأظهرت نتائج التحليل وجود تشابه بين تسلسل النيوكليوتيدات قيد الدراسة والتسلسلات المسجلة في بنك الجينات وبلغت النسبة (98.57 -100)%، ودخلت تحت الرقم (*PQ395287.1) (PQ395289.1) (PQ395288.1)*).

الكلمات المفتاحية: نبات العرن المثقوب، حشيشة القلب، *Hypericum Perforatum*، التوصيف الجزيئي، تقدير *DNA*.

المقدمة:

احتلت النباتات الطبية أهمية كبيرة في مجال البحث العلمي [1]، لذا يعد فهم المؤشر الوراثي ودراسته باستعمال تقنية التفاعل التضاعفي التسلسلي لتحديد التنوع الوراثي بين الأنواع أو الأصناف المختلفة ومعرفة الأنواع الأكثر فعالية من الناحية الطبية والأكثر تكيفًا مع الظروف البيئية له أهمية علمية وعملية لتصنيف النبات وهذا يساعد في تحسين طرق الزراعة والإنتاج ويوفر قاعدة بيانات وراثية تساعد في فهم العلاقة بين الجينات المختلفة والتعبير الجيني المرتبط بخصائص النبات [2].

وان تتبع الأصل الجغرافي امر مفيد في دراسة التكيف البيئي وتخطيط زراعة النباتات الطبية، ومنها نبات العرن المثقوب *Perforatum Hypreicum*، وهو نبات مزهر ينتمي الى العائلة العرنيةHypericaceae، التي تضم حوالي 55 جنساً واكثر من 1000 نوع [2]، وله قيمة دوائية وبيئية [3]، وهناك اسماء عدة للنبات مثل نبات العرن المثقوب (نسبة الى النقاط الشفافة في أوراقه التي تبدو كأنها ثقوب وهي غدد زيتية) وعشبة السعادة، ولكن الاسم الشائع عشبة القديس يوحنا المعمدان سانت جون لإزهار النبات في منتصف الصيف (يوم القديس) [4]. وهو عشب معمر، ساقه قائمة يصل ارتفاعه (30-100) سم، والأوراق شكلها اهليجي بها نقاط شفافة، والازهار مكونة من بتلات صفراء تحمل الاوبار الافرازية. وهو يزهر في بداية الصيف وينتشر في غرب اسيا وأوروبا. للنبات تاريخ طبي طويل، يحتوي هذا النبات على مركبات كيميائية فعالة التي توجد في قممه المزهرة، اذ وتحوي ازهاره على زيت طيار ومركبات فعالة، فضلا عن وجود الفينولات والأحماض الدهنية والفلافونيدات في أوراقه وأزهاره [6]، تشتهر عشبة العرن المثقوب بإمكانياتها في علاج الاكتئاب الخفيف الى المتوسط نسبة الى مركباتها النشطة مثل Hyperforin وHypericin، والتي يعزى اليهما التأثيرات المفيدة إذ تعملان على تعزيز مستويات الناقل العصبي الدوبامين النورأدرينالين والسيروتونين، مما يعزز تنظيم الحالة المزاجية وتخفيف اعراض الاكتئاب، لذلك يختاره المرضى بديلا عن الأدوية [5]، ويستخدم النبات بشكل واسع لعلاج اضطرابات النوم والقلق والآم الاعصاب [6]، فضلا عن ذلك يستخدم كمضاد للبكتيريا والطفيليات والتهاب الجروح [7]، وفقاً لبيانات أبحاث السوق العالمي انه في الولايات المتحدة الامريكية وحدها في عام 2016 فقط بلغ إجمالي مبيعات المكملات العشبية أكثر من 7.4مليار دولار أمريكي [8]، ونظراً للطلب المتزايد للعلاج بالأعشاب الطبية فمن الأهمية توفير قاعدة بيانات تحتوي على باركود معلومات المواد الاصلية النباتية والمواد الملوثة المحتملة لها، وعليه توفر قاعدة البيانات رموز شريطية للحمض النووي لاسترجاع البيانات والبحث عن التشابه. فمثلاً تم استخدام المناطق الجينومية ITS للترميز الشريطي للحمض النووي ومن اجل الحصول على هذه الرموز الشريطية، تطبق العديد من الطرق الجزيئية لتحديد المواد النباتية الطبية، وتحديد هوية النباتات الطبية، وتوصيفها [9]، ويتم ذلك عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، وهي طريقة حساسة وسريعة ومحددة في تضخيم تسلسل الأحماض النووية في المختبر باستخدام بادئات نيوكليوتيدية محددة، وبوليمير الحمض النووي ويمكن لهذا التفاعل او التقنية تضخيم ملايين النسخ ويستخدم هذا التفاعل اساس للعديد من الاختبارات الجزيئية التشخيصية السريرية في المختبرات في كل ارجاء العالم [10]، إذ يتكون الحمض النووي DNA من سلسلتان متكاملتان من النيوكليوتيدات ويتم تنظيم الحمض النووي في هياكل طويلة تسمى الكروموسومات وتحتوي على سلاسل طويلة من الجينات [11].

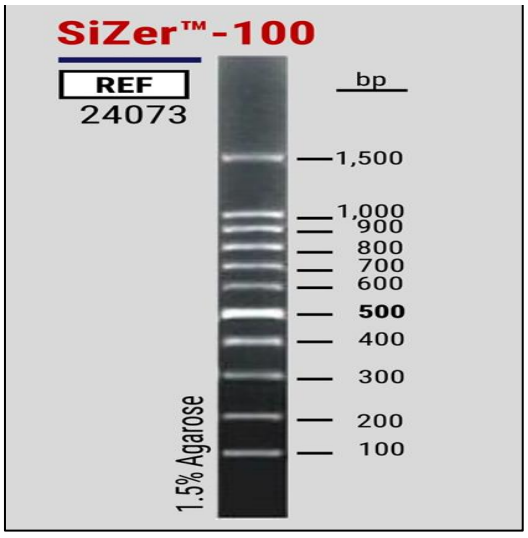
يهدف البحث إلى معرفة الموقع التصنيفي باستعمال التشخيص الجزيئي لنبات حشيشة القلب (العرن المثقوب) *H. Perforatum*، لأول مرة في محافظة نينوى.

المواد وطرائق العمل:

جمعت عينات من أوراق النوع *Hypericum Perforatum* النامي في ناحية زمار التابعة لمحافظة نينوى وكانت بعمر لا يتجاوز (3-4) اسابيع التي تكون خالية من الإصابات الحشرية والمرضية، واجري التحليل الجزيئي في مختبرات التقنيات الإحيائية لشركة المسيب/العراق/بغداد. تم الاعتماد على طرق التوصيف والتشخيص الجزيئي بالاعتماد على الحمض النووي DNA للنوع *H. Perforatum* لأجل تصنيفه، عن طريق عزل الحمض النووي DNA وتنقيته بالاعتماد على عدة (i-Taq TMDNAPOLY merase)، وباستعمال الكت Favor Prep^{TM} Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit وفقاً لما جاء في تعليمات الشركة المصنعة الكورية.

أولا: استخلاص الحمض النووي من نبات العرن المثقوب: حضرت بطحن 50 ملغم من الوزن الرطب. ثم اضيف 400 مايكروليتر من محلول FAPG1 و8 مايكروليتر من محلول RNase A (50ملغم/مل) ورج بقوة. وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين ثم عند 65 درجة مئوية لمدة (10 - 20) دقيقة وقلب الخليط 2-3 مرات أثناء الحضانة. ثم اضيف 130 مايكرومتر من محلول FAPG2 إلى الخليط، ورُج الخليط بقوة لخلطه جيداً وأحضن الخليط على الثلج لمدة 5 دقائق. بعدها وضع عمود الترشيح في أنبوب التجميع ونقل الخليط بالكامل من الخطوة السابقة إلى عمود الترشيح، واكملت الطريقة حسب [13] ,[12].

ثانيا: تحديد تركيز الحمض النووي والترحيل الكهربائي الهلامي لتحليل جودة الحمض النووي: حضر حسب [14] باستعمال محلول الاكاروز عن طريق إذابة 1غرام من مسحوق الاكاروز في 100مل من TBE×1 في دورق سعته (100مل)، وتمت إذابة الاكاروز في كتلة ساخنة حتى أصبح المحلول صافياً. ثم برد محلول الاكاروز الى حوالي (55-50) درجة مئوية، مع تحريك الدورق من حين لآخر ليبرد بالتساوي. اضيف صبغة حمراء (3 مايكرولتر) إلى الجل الدافئ ثم تم سد أطراف صينية الصب بطبقتين من الشريط اللاصق. ثم تم وضع الأمشاط في صينية صب الجل الهلامية. سكب محلول الاكاروز المذاب في صينية الصب. وترك الاكاروز ليتصلب في درجة حرارة الغرفة، وتم سحب المشط بعناية وتم إزالة الشريط اللاصق، تم وضع الجل على غرفة الترحيل الكهربائي المملوءة بمحلول TBE ×1. تم خلط عينات الحمض النووي (5مايكرولتر) مع (3مايكرولتر) من محلول تحميل الحمض النووي وتحميلها في حفرهلام الاكاروز. تم إكمال الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند جهد 70 فولت،65 أمبير لمدة ساعة واحدة. وتمت ملاحظة الحمض النووي من خلال مشاهدته تحت ضوء الاشعة فوق البنفسجية UVtrans illuminator.



الشكل (1) الترحيل الهلاميGel electrophoresis لاستخراج الحمض النووي الجينومي DNA من النبات والدليل الحجمي للـ DNA

ثالثا: تقدير الاحجام الجزيئية للحامض النووي DNA: قدرت الاحجام الجزيئية للحامض النووي DNA بالاعتماد على إجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 1.5%. باستخدام الدليل الحجمي الذي يمثل قطع من الحامض النووي DNA حجمها الجزيئي معلوم متمثل بالدلائل الحجمية Markers. إذ أن المسافة التي قطعتها الجزيئات في الهلام تناسبت عكسياً مع أحجامها الجزيئية وقد استعمل الدليل SiZer DNA Markers (intron) إذ اعطى هذا الدليل في هلام الاكاروز حزم ذات أوزان جزيئية معروفة وكما مبين بالشكل رقم (1).

رابعا: البادئات المستخدمة في التفاعل: جففت البادئات بالتجميد، ثم اذيبت في محلول ddH2O (ماء مقطر منزوع الأيونات) لاعطاء تركيز نهائي 100 بيكومول/مايكرولتر كمحلول مخزون، واحتفظ بالمحلول المخزون عند درجة حرارة -20 لتحضير محلول تركيزه 10بيكومول/مايكرولتر كمحلول تمهيدي،إذ تم وضع 10مايكرولتر من المحلول المخزون في 90مايكرولتر من ماء ddH2O للوصول الى الحجم النهائي 100مايكرولتر. تم الإخبار اعتمادا على تعليمات شركة التقنيات الكندية المتكاملةIntegrated DNA Technoiogies Company Canaola (IDT).

خامسا: أهم البادئات المستخدمة في الدراسة وكما مبينة في الجدول 1 كما يلي:

الجدول (1) تسلسل البادئات المستخدمة في الدراسة

Primer	Sequence	Primer sequence	Tm (°C)	GC%	Size of Product (bp)
5.8S ribosomal RNA gene	F	5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′	61.64	63.16	734 bp
	R	5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	55.09	45.00	

سادسا: الكشف عن جينات ITS باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR: باستخدام تقنية PCR مع زوج البادئات تم إجراء الكشف عن منطقة الاستنساخ الداخلي لتحديد العزلة النباتية للنوع إذ تم تضخيم جزء من ITS باستخدام البادئان الاساسي F والعكسي R. اجري تضخيم بحجم إجمالي قدره 25 مايكروليتر يحتوي على 1.5 مايكروليتر من الحمض النووي و5 مايكروليتر Intron (Pre mix PCR) كوري المنشأ، استخدم 1 مايكروليتر من كل بادئ، ثم تم إضافة الماء المقطر إلى الأنبوب للوصول إلى الحجم الكلي من 25 مايكروليتر. أجريت ظروف التدوير الحراري وفق ما جاء به وكما مبين في الجدول،تم مضاعفة الحمض النووي باستخدام خطوات وظروف تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الانية كما مبين في الجدول (3) تم عمل مسح أولي Initial Denaturation للحمض النووي DNA لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 95 مْ متبوعة بـــ35 دورة مؤلفة من عملية مسخ نهائي Denaturation-2 لمدة 45 ثانية في درجة حرارة 95مْ، ثم حدوث ارتباط البوادئ Annealing لمدة 1 ثانية في درجة حرارة 56مْ، ثم استطالة أولية لبادئ ناتج الحمض النووي المضاعف لمدة ثانية في درجة حرارة 72مْ، وأخيراً إنهاء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بخطوة الاستطالة النهائية لمدة خمس ثو اني في درجة حرارة 72مْ.

الجدول (2) مكونات تفاعل PCR

Component	25 µL (Final volume)
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

الجدول (3) البرنامج الخاص بالتفاعل التسلسل التضاعفي المتخصص

No.	Phase	Tm (°C)	Time	No. of cycle
1-	Initial Denaturation	95°C	5 min	1 cycle
2-	Denaturation -2	95°C	sec45	35 cycle
3-	Annealing	56°C	1 min	
4-	Extension-1	72°C	1 min	
5-	Extension -2	72°C	5 min.	1 cycle

سابعا: الكشف عن تسلسل القواعد النتروجينية وتعيين المخطط الشجري: اجري تحليل التتابع النيوكليوتيدي (Sequencing Analysis) يعد الحصول على نتائج الترحيل الكهربائي من خلال نتائج تضاعف الجين DNA ،وتم تحديد تتابعات النيوكليوتيدات للعزلة بإرسال الحزم الناتجة من ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل الى الشركة الكورية Biotechnology، وتتم باستخدام جهاز(Appliced Biosystem DNA Secuencer)، وتم مقارنة النتائج من خلال الشبكة العنكبوتية باستخدام أداة البحث Basic Aligmmente Search Tool (BLAST)، إذ تم تحديد تسلسل القواعد النتروجينية لحزم الحمض النووي لمورثات النوع المدروس من قبل المركز الوطني لمعلومات التقنات الحيوية National Centre for Biotechnology Information (NCBI) وتم إجراء التطابق لتتابعات النيوكليوتيدات لنبات *H.Perforatum* حسب التطابق في قاعدة البيانات، وبعد الانتهاء من التشخيص تم تسجيل النبات في البنك الوراثي واعطاء رقم الانضمام العالمي، ثم رسم شجرة التطور Phyiogenetic Tree باستعمال برنامج Mega اعتماداً على تسلسل النيوكليوتيدات للعزلات المسجلة في بنك الجينات Gene Bank. وتم توصيف النبات إلى مستوى النوع

والسلالة بالاعتماد على تعيين تسلسل القواعد النتروجينية، واعتمدت طريقة Sanaco وLeong (1989) للعمل وتم حساب تركيزDNA الجينومي بالاعتماد على [15].

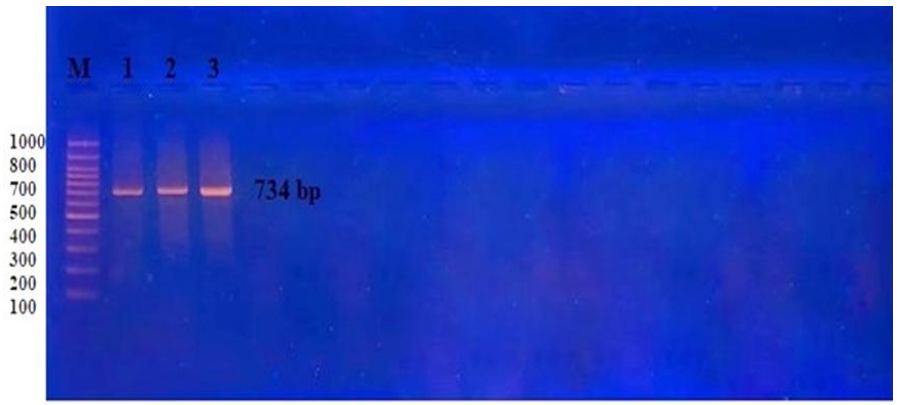
النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج التشخيص الجزيئي لنبات العرن المثقوب*H. Perforatum* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من خلال استعمال زوج البادئات المتخصصة الكشف عن الجينات في منطقة فاصل النسخ الداخلي ITS (Internal Transcribed Spacer) وهي:

البادئ الامامي5 :ITS_1F (TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3)

البادئ العكسي (3-ITS_4R: 5: TCCTCCGCTTATTGATATGC)

وأظهرت نتائج تحلل الترحيل الكهربائي كما في الشكل (2) باستعمال هلام الأكاروزبتركيز1.5%، إذ عرض للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 254 نانوميتربواسطة UV traslluminator للكشف عن حزم DNA كان مطابقاً لما جاء في تصميم البادئ المسؤول كمحدد لتضخيم المورثات ITs_1 وITs_4 وظهرت الحزم أثناء الترحيل بحجم 734 زوج قاعدة.



الشكل (2) ناتج التضخيم للموروث ITS4 وITS1 الحزمة (1و2و3) تمثل النتيجة الموجبة عند (الزوج القاعدي) للنوع *Hypericum Perforatum* المقياس الجزيئي 734 زوجاً قاعدياً

يوضح الشكل (2) ناتج الحمض النووي (734 pb-PCR product) باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من النوع المدروس باستخدام زوج البوادئ ITs_4 وITs_1. علماً أن M تمثل سلم الحامض النووي – Molecular (weight size marker) بعدد أزواج القواعد النتروجينية (bp) وبأحجام مثبت كل منها على الجانب الأيسر من الشكل، ويمثل المسار(1و2و3) النتيجة الموجبة لوجود الحزم المتمثلة لنبات *H. Perforatum*.

الجدول (4) تحليل تسلسلات القواعد النتروجينية لقطع DNA للمورث (ITS4 وITS1)لنبات العرن *H. Perforatum*

Source: Hypericum perforatum; 5.8S ribosomal RNA gene						
No. Of sample	Type of substitution	Location	Nucleotide	Sequence ID with compare	Sequence ID with submission	Identities
1	--------	-------	------	ID: ON685357.1	ID: PQ395287.1	100%
2	Transvertion	2135	G\C	ID: ON685357.1	ID: PQ395288.1	99%
	Transition	2136	T\C			
	Insertion	2159	A\G			
3	--------	-------	------	ID: ON685357.1	ID: PQ395289.1	100%

وبين الجدول (4) نتائج مقارنة تسلسلات القواعد النتروجينية في DNA في نبات العرن المثقوب وبيان مدى تقاربها مع التسلسلات الموجودة والمسجلة في بنك الجينات لتأكيد التشخيص، إذ أظهرت هذه النتائج وجود تشابه بنسبة 100% بين هذه التسلسلات وتسلسلات نبات العرن المثقوب المسجلة في بنك الجينات بالرقم ON:685357.1 PQ:395287.1 وبنسبة 99% بالرقم PQ:395288.1 ON:685357.1 وبنسبة 100% بالرقم ON:685357.1

PQ:395289.1 ولوحظ وجود 3 مناطق للانتقال بين القواعد النتروجينية لنبات *H.Perforatum* مما تسبب ذلك في حدوث طفرات من نوع الانتقالية واستبدال للقواعد النتروجينية عند المواقع (2135، 2136، 2159) وكذلك تؤثر الطفرات على الشفرات الوراثية ومن ثم على الاحماض الامينية المشفرة وكما مبين في الشكل (3).

Hypericum perforatum subsp. perforatum isolate BPTPS035 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

Sequence ID: ON685357.1Length: 3730Number of Matches: 1

Range 1: 1681 to 2170GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

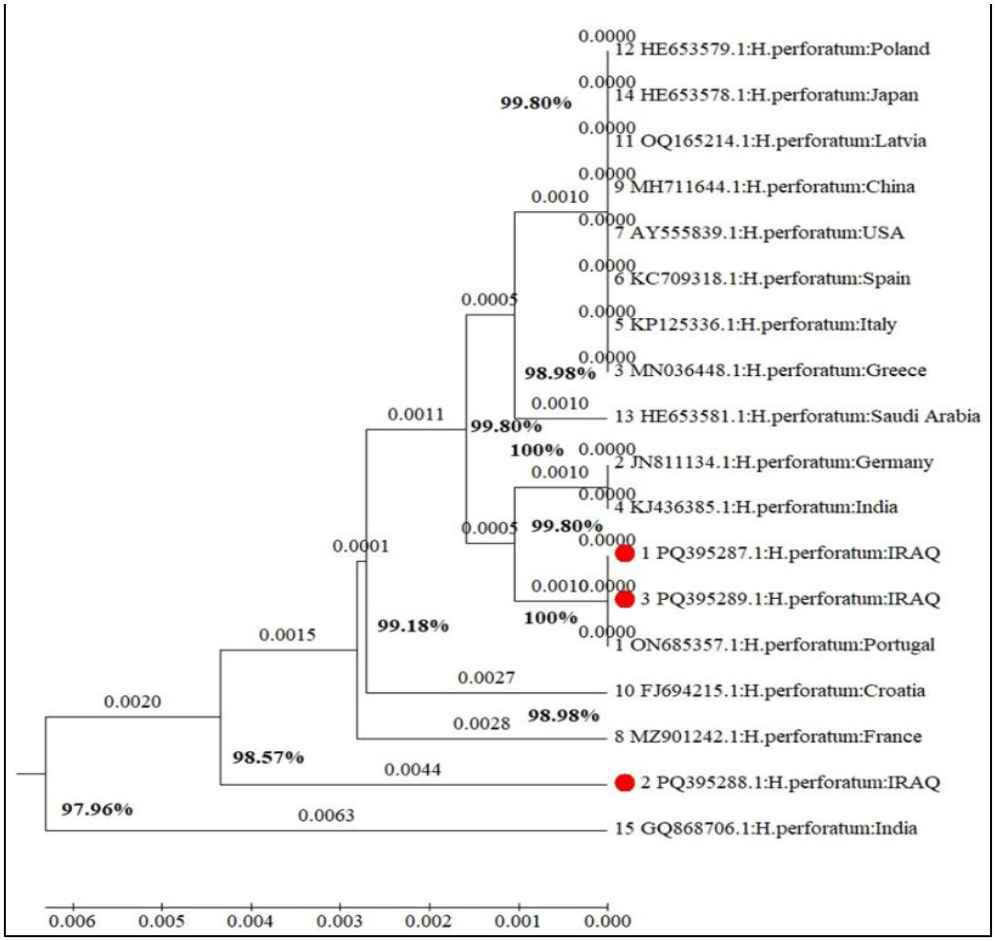
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
889 bits(481)	0.0	487/490(99%)	0/490(0%)	Plus/Plus

```
Query 1 TCACCTGCCCAACAAACAAACCCCGGCGCGGCACGCGCCAAGGAACTTTTGCATCATAAG 60
Sbjct 1681 ..................................................... 1740
Query 61 AAGTGTAAGGCTCCCGGCTGTGCCGGAAATCGGACAACACGGTTGGGGGCCTCCTTCTGT 120
Sbjct 1741 ..................................................... 1800
Query 121 TCATAACAATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTA 180
Sbjct 1801 ..................................................... 1860
Query 181 GCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGC 240
Sbjct 1861 ..................................................... 1920
Query 241 AAGTTGCGCCCGAAGCCTTCTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGTGTCACACATCGTCGC 300
Sbjct 1921 ..................................................... 1980
Query 301 CCCCCAAAATCCCGATATCTTGCAAGAGACAATCGGGAATAGGATGGGCGGAAAATGGTC 360
Sbjct 1981 ..................................................... 2040
Query 361 TCCCGTGCGCTCCCGTTCGCGGTTGGCCCAAAAATGAGTTCCTGGCAAAGCAAAGCCACG 420
Sbjct 2041 ..................................................... 2100
Query 421 ACCAGCGGTGGTTGTAAGACCCTCGGTACAAGTCCCGAGCCTTGCATTGCTCGTAGGGGC 480
Sbjct 2101 .....GT.....A. 2160
Query 481 ATGTTGACCC 490
Sbjct 2161 ..... 2170
```

الشكل (3): مقارنة تتابع القواعد النيتروجينية للمورث (ITs_1 وITs_4) للنوع *H. Perforatum* (sbjct) مع تسلسل القواعد النيتروجينية للعينات المثبتة مسبقا في الجينات العالمي NCBI.

من الشكل (4) نلاحظ مستوى التقارب على المستوى الجيني انه كان كبيراً عند تحليل الشجرة الوراثية للنوع *H. Perforatum* (عزلة العراق) والتي (سجلت بالرقم ID:ON 685357.1) مع العزلات العالمية، وكانت أكثر تقاربا وبنسبة تطابق بلغت 100% مع العزلة البرتغالية تحت رقم انضمام ID: ON685357.1،من جانب اخر بلغت نسبة التطابق 99% مع كل من العزلات التالية: الألمانية تحت رقم انضمام ID: JN811134.1 واليونانية تحت رقم انضمام ID:MN036448.1 والهندية تحت رقم انضمام ID:KJ436385.1 والإيطالية تحت رقم انضمام ID: KP125336.1، والاسبانية تحت رقم انضمام ID: KC709318.1 والأمريكية تحت رقم انضمام ID: AY555839.1 والفرنسية تحت رقم انضمام ID: MZ901242.1 والصينية تحت رقم انضمام ID: MH711644.1، والكرواتية تحت رقم انضمام ID: FJ694215.1 واللاتيفية تحت رقم انضمام ID: OQ165214.1 والبولندية تحت رقم انضمام ID: HE653579.1 والسعودية تحت رقم انضمام ID: HE653581.1، وبنسبة تطابق بلغت 98% مع كل من العزلتين اليابانية تحت رقم انضمام ID: HE653578.1 والهندية تحت رقم انضمام ID: GQ868706.1.

وهذه النتائج تطابق ما وجده كلا من [20] ,[19], [18], [17], [16]



الشكل (4) مخطط الشجرة الوراثية للنوع *Hypericum Perforatum* المعتمد من قبل NCBI

المصادر:

[1] G. Y. Q. Al-Hatem, "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, 2018.

[2] جهان يحيى الحاتم؛ لبنى ياسين عباس؛ ايناس رافع قاسم" ,التشخيص الجزيئي لنوعين من نباتات جنس Euphorbia النواميين في محافظة نينوىin ".. *المجلة العراقية للبحوث الإنسانية والاجتماعية والعلمية*, اربيل: كلية التربية الأساسية جامعة صلاح الدين.2023 ,

[3] H. H. Affat and M. S. Rashid, "Impact Of Hypericum Perforatum Extract On Histological Stracture And Some Physiological Parameters With Ameliorating Effect Of Omega-3 On Kidney Of Albino Rats," *International Innovations Journal of Applied Science*, vol. 1, no. spc, 2024.

[4] R. K. Selvakesavan, M. Nuc, V. Kolarčik, P. Krajewski, and G. Franklin, "Single Molecule Real-Time Sequencing Data Sets of Hypericum perforatum L. Plantlets and Cell Suspension Cultures," *Sci Data*, vol. 11, no. 1, p. 42, 2024.

[5] V. S. Velingkar, G. L. Gupta, and N. B. Hegde, "A Current Update on Phytochemistry, Pharmacology and Herb–Drug Interactions of Hypericum perforatum," *Phytochemistry Reviews*, vol. 16, pp. 725–744, 2017.

[6] وائل محمد الأغواني, *النباتات الطبية واستخداماتها العلاجية*, الاولى. الكويت: دار المركز العربي لتأليف وترجمة العلوم الصحية للنشر والتوزيع.2024 ,

[7] J. Adadzi and N. A. Kerna, "St. John's Wort (Hypericum perforatum) in Major Depressive Disorder: Efficacy, Safety, Clinical Implications, and Its Role as an Herbal Alternative or Complementary Treatment," 2024, *Authorea*. doi: 10.22541/au.172782161.12647676/v2.

[8] M. Kenda, N. K. Glavač, M. Nagy, and M. S. Dolenc, "Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update," *Molecules*, vol. 27, no. 18, p. 6021, 2022.

[9] S. Z. Nobakht, M. Akaberi, A. H. Mohammadpour, A. T. Moghadam, and S. A. Emami, "Hypericum perforatum: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions," *Iran J Basic Med Sci*, vol. 25, no. 9, p. 1045, 2022.

[10] J. Barnes, J. T. Arnason, and B. D. Roufogalis, "St John's wort (Hypericum perforatum L.): botanical, chemical, pharmacological and clinical advances," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 71, no. 1, pp. 1–3, 2019.

[11] N. Techen, I. Parveen, Z. Pan, and I. A. Khan, "DNA Barcoding of Medicinal Plant Material for Identification," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 25, pp. 103–110, 2014.

[12] S. H. Sathyanarayana and L. M. Wainman, "Laboratory Approaches in Molecular Pathology: The Polymerase Chain Reaction," in *Diagnostic Molecular Pathology*, Academic Press, 2024, pp. 13–25.

[13] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. New York, 2002. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/

[14] D. Mockutė, G. Bernotienė, and A. Judzentiene, "Volatile compounds of the aerial parts of wild St. John's wort (Hypericum perforatum L.) plants," *Chemija*, vol. 14, no. 2, pp. 108–111, 2003.

[15] D. A. Samac and S. A. Leong, "Characterization of the Termini of Linear Plasmids from Nectria haematococca and their Use in Construction of an Autonomously Replicating Transformation Vector," *Journal of Current Genetics*, vol. 16, no. 3, pp. 187–194, 1989.

[16] R. Percifield, S. Hawkins, McCoy, M. P. Widrlechner, and F. Wendel, "Genetic Diversity in Hypericum and FP Markers for Species-Specific Identification of H. perforatum," *Planta Med*, vol. 73, no. 15, pp. 1614–1621, 2007.

[17] D. Freifelder, *Molecular biology, a comprehensive introduction to prokaryotes and eukaryotes*. Science Books International. Van Nostrand Reinhold Comp., USA, 1983.

[18] R. A. Al-Annaz and J. Y. Al-Hatim, "The study of some anatomical indicators and molecular genetics of Santolina insularis plant that grows in Iraq," *Appl Biochem Microbiol*, vol. 59, no. S1, pp. 299–305, 2023, doi: 10.5281/zenodo.7605386.

[19] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0," *Mol Biol Evol*, vol. 30, pp. 2725–2729, 2013.

[20] K. Tamura, M. Nei, and S. Kumar, "Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method," *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, vol. 101, pp. 11030–11035, 2004.

[21] P. H. A. Sneath and R. R. Sokal, *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman, 1973.

[22] L. Zybartaitė, J. Žukauskienė, E. Kupčinskienė, and A. Paulauskas, "Adoption of RAPD-Related Methodology for Analyses of Hypericum maculatum Crantz Growing Wild in Lithuania," *Biologija*, vol. 57, no. 3, 2011, doi: 10.6001/biologija.v57i3.1877.