جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

أستخدام الـ RAPD في تحليل التغايرات الوراثية لأنسال كالس مزارع المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر *Stevia rebaudiana* Bertoni

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

إيناس جاسم إبراهيم

بكالوريوس علوم حياة 2005- 2004

بإشراف

أ.م.د

مثنى محمد أبراهيم

أ.م.د

أسيل كاظم هادي

1442هـ

2021

1- المقدمة Introduction

يعتبر نبات ورق السكر *Stevia rebaudiana* Bertoni أحد النباتات الطبية المهمة، يعرف باللغة الإنكليزية بعدة أسماء ومنها Suger bush أو Candy leaf plant أو Honey plant أوSweet leaf plant (Mubarak وآخرون ،2008). ينمو النبات كشجيرة صغيرة عشبيه شبه كثيفة معمرة تنتمي الى العائلة النجمية Asteraceae، موطنها شمال شرق الباراجواي وتتواجد أيضا في البرازيل والأرجنتين (Soejatro وآخرون 2002). يوجد أكثر من 200 نوع نباتي تنتمي جميعها الى جنس Stevia ، لكن الأكثر شيوعآ منها *S.ovata* و *S.plummerae* و*S.rebaudiana S.salicifollia* و *S.serrsta* و وأكثرها حلاوة هو *Stevia rebaudiana* Bertoni(Beement وآخرون، 2012) . يبلغ إرتفاع النبات حوالي 70–60 سم (Savita وآخرون 2004) ، له سيقان رفيعة متفرعة القمة ، الأوراق متقابلة على الساق بطول 55–65 ملم وعرض 21–31 ملم. يحمل النبات نورات زهرية عنقودية ذات أزهار صغيرة الحجم مجتمعة في سلاسل صغيرة (Lyakhovkin وآخرون، 1993). يمكث نبات ستيفيا لمدة قد تصل الى سبع سنوات في الارض ، وهو أحد نباتات النهار الطويل إذ يحتاج النبات الى مدة إضاءة تتراوح من 12–13 ساعة كافية لعملية الإزهار وساعات نهار أطول تتراوح من 14–16 ساعة للنمو الخضري وزيادة غلة الأوراق (Ceunen و Geuns ، 2013 و Yoneda وآخرون ، 2017).

يعد إكثار النبات جنسيا أمراً صعباً ، وذلك لأن أزهار هذا النبات غير متوافقة ذاتياً(Yadav وآخرون 2014).إضافة إلى إختلاف التركيب الوراثي للنباتات الناتجة من البذورمما يؤدي الى إختلاف في محتواها من المادة الحلوة كماً ونوعاً(Miyagawa وآخرون ، 1986). إن معدلات إنبات البذور الضعيفة وعدم كفاية التلقيح الخلطي يؤدي الى عدم التجانس للنباتات لذا يفضل إكثارها عن طريق العقل الجذعية (Turgut وآخرون 2015) وتعد تقانة زراعة الانسجة النباتية واحدة من الوسائل المهمة لإكثار العديد من النباتات وبكميات كبيرة وفي مدة زمنية قصيرة ، إذ إن خلايا الجزء النباتي لها القابلية على التضاعف الى الآف النباتات في اقل من سنة (Devi ،2003).

ولنبات Stevia اهمية من الناحية الطبية والإقتصادية إذ تعد أوراقه مصدراً لكلوكوسيدات التربينات الثنائية مثل Steviolbioside و Rebaudioside A,B,C,D,E و Rubsoside وDulcoside و Stevioside (Starratt واخرون، 2002) الذي يعد مادة أولية لإنتاج السكر المستعمل للمواد الغذائية لاسيما الطعام والأغراض الصناعية الأخرى وهذا مايفسر البحث المستمر للدول المتقدمة وخاصة الدول التي ينجح فيها زراعة هذا النبات وإنتاجه الى الزيادة في إكثاره ونشر زراعته (العبيدي وخير الله ،2017). تعد عشبة ستيفيا من المحليات الآمنة لمرضى السكري لما لها من خصائص مختلفة كتنظيم السكر في الدم ومضاد لإرتفاع ضغط الدم وتسوس الأسنان ومضاد للجراثيم والفيروسات ومضاد للفطريات ومدر للبول وموسع للأوعية الدموية (Singh و Rao ، 2005 و Mathur و Begum ، 2015) ، كما أنها ذات كربوهيدرات منخفضة وتستخدم في بعض الحميات الغذائية (Abo Elnaga وآخرون ، 2016) ، وتقلل من تناول الطعام وتعتبر كمضادات للسمنة (Ranjbar و Masoumi ، 2018).

يمكن تعريف المعلقات الخلوية على انها مجموعة من خلايا مفككة تتكون من تفكك نسيج الكالس الهش أو من النسيج المتوسط للأوراق النامية في وسط سائل متحرك ، ويفضل إستخدام الكالس الهش غير المتماسك والسريع النمو لإنشاء مزارع المعلقات الخلوية لسهولة تفككها الى خلايا مفردة أو كتل صغيرة من الخلايا بواسطة التحريك المستمر في الوسط الغذائي السائل ، وتتميز المعلقات الخلوية النموذجية بإحتوائها على نسبة عالية من الخلايا المفردة ونسبة قليلة من المستعمرات الخلوية ويعتمد ذلك أساساً على البنية الهشة للكالس ، ونوع الوسط الغذائي السائل المستخدم (Ramawat وآخرون 2008).

ويستفاد من مزارع المعلقات الخلوية للحصول على نباتات كاملة كأنسال Clones جديدة من الخلايا المفردة التي تتميز بخواص مرغوبة بعد إختبارها وإنتخابها مثل مقاومة المبيدات والأمراض وتحمل الملوحة والبرودة والمعادن الثقيلة (Martinez–Estevez وآخرون ، 2001 و Andrade وآخرون ، 2009) . و يمكن الإستفادة من مزارع المعلقات الخلوية من خلال الزيادة في إنتاج مركبات الأيض الثانوي ، والمركبات الصيدلانية بالأضافة الى إستثمار المال والوقت الآزم للإنتاج (Davies و Deroles ،2014).

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية ومختبر الوراثة الجزيئية في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى للكشف عن التغاير الوراثي بين أنسال الكالس المشتق من زراعة الخلايا المعلقة لنبات *Stevia rebaudiana* Bertoni وتقدير تركيز مركب الستيوسيد Steviosid . أُختبر 27 نسلاً بإستخدام 15 بادئ ذو 10 قواعد نتروجينية مختلفة بمؤشرات RAPD، أظهرت 5 بوادئ فقط تنوعاً وراثياً ضمن الأنسال ، حيث انقسمت الى اربع مجاميع رئيسية حسب تباعدها الوراثي إذ إنعزل النسل 20 في مجموعة رئيسية واحدة ، وظهرت 41 حزمة متعددة الشكلPolymorphic band ولم تظهر حزم احادية الشكل Monomorphic band. سجل النسل 20 أعلى قيمة للـSteviosid بلغت 2.614 مايكروغرام. لتر$^{-1}$ والذي تقارب وراثياً مع النسل 15 لذا نرى أن نسبة في هذا النسل أخذت المركز الثاني بعد النسل 20 ، إذ كانت 1.254 مايكروغرام.لتر$^{-1}$ وقد بلغت قيمة Steviosid في النسل 10 أقل قيمة سُجلت بين الأنسال قيد الدراسة ، بالرجوع الى الشجرة الوراثية نجد أن النسل 20 ينفصل عن باقي الأنسال ويتباعد وراثياً وهذا يؤكد أن المواد الفعالة تتأثر وراثياً ، و بلغت قيمة Steviosid في النسل 6 هي 0.712 مايكروغرام .لتر$^{-1}$ علماً انه تقارب وراثياً من النسل 10 ، يمكن القول بأن وجود التمايز الوراثي والتغاير في الأنسال يؤثر في نسبة المواد الفعالة ، إذ كلما إبتعدت الأنسال عن بعضها وراثياً كلما قلت نسبة المواد الفعالة في النبات .

تعتبر مؤشرات الدنا من أوسع الأدوات في الكشف عن التغايرات على المستوى الجزيئي. ومن تقاناتها الـ RAPD وهي من التقانات التشخيصية وتعتمد على عدد البوادئ المستخدمة ، والتي تعطي مؤشر على بعض الفوارق بين العينات بالإعتماد على عدد الحزم الناتجة ، في حين تتعامل الدراسات المظهرية والتشريحية والكيمياوية مع عشرات الصفات فإن الدراسة الجزيئية والوراثية تتعامل مع ملايين الجينات والصفات ، وتتضمن العديد من التقنيات ومن بينها تقنية التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD–PCR (Kumar و Gurusubramanian ،2011) إذ يتم فيها تضاعف مواقع على شريط الدنا بإستعمال بادئات عشوائية تقوم بالبحث عن مواقع مكملة لها على شريط الدنا وذلك للأرتباط به ومضاعفته ، حيث يتكون من هذا التضاعف قطع من الدنا تكون مختلفة الأطوال والأعداد اعتماداً على عدد مواقع الإرتباط والبعد بين موقع وآخر (Bardakci ، 2001).

هدفت هذه الدراسة الى

1–إكثار النبات وإنتاج أنسال مختلفة عن طريق الكالس الناتج من المزارع الخلوية لنبات Stevia للتغلب على حالة عدم التوافق الذاتي في النبات .

2–الكشف عن التغايرات الوراثية في أنسال الكالس الناتج من زارعة المعلقات الخلوية لنبات Stevia عن طريق تقانة RAPD – PCR وتحديد التباعد الوراثي بينها .

3–الكشف والتقديرالكمي لمركب Stevioside في أنسال الكالس الناتجة بتقنية HPLC ومقارنة الأختلافات في كمية مركب Steviosid في الأنسال مع قيم البعد الوراثي لها .