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

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of Education for Pure Science

Department of Biology

Use of RAPD for genetic variations analysis of callus colonies from cell suspensim cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni plant

A thesis

Submitted to the concil of College of Education for Pure Science/ University of Diyala as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of M.Sc.in Biology

By

Enas Jassim Ibrahim

Supervised by

Assistant Professor

Dr.Muthana Muhamad Ibrahem (Ph.D)

Assistant Professor

Dr.Aseel Kadhim Hade(Ph.D)

2021 A.D

1442 A.H

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).

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 .

I

Abstract

This study was conducted in the Laboratory of Plant Cells and Tissues Culture and the Molecular Genetics Laboratory at the College of Education for Pure Sciences / University of Diyala to detect the genetic variation between callus lineages derived from the culture of suspended cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni and to estimate the concentration of Steviosid. 27 offspring were tested using 15 primers with 10 different nitrogen bases with RAPD indicators, only 5 primers showed genetic diversity within the lineages, where they were divided into four main groups according to their genetic spacing as the offspring were isolated 20 in one main group, and 41 polymorphic band appeared and did not show single bundles Monomorphic band.

The offspring 20 had the highest Steviosid value of 2,614 µg. L-1, which is genetically close to the offspring 15, so we see that a proportion in this offspring took the second place after the offspring 20, as it was 1.254 micrograms. L-1 and the value of Steviosid in offspring 10 was the lowest value recorded among the offspring under study, by reference to the genetic tree We find that offspring 20 is separated from the rest of the offspring and diverging genetically, and this confirms that the active substances are genetically affected, and the value of Steviosid in offspring 6 is 0.712 micrograms per liter -1, knowing that it is genetically close to offspring 10, it can be said that the presence of genetic differentiation and heterogeneity in the offspring affects In the ratio of active substances, as the further the lineages are genetically separated from each other, the less active substances are in the plant.