



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

**أستخدام الـ RAPD في تحليل التغيرات 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.

أسيل كاظم هادي

2021

أ.م.د.

مثنى محمد أبراهيم

1442هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا
نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ
وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ انْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ
لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

صدق الله العظيم

سورة الأنعام الآية (99)

الشكر والتقدير

في البداية أحمد الله وأشكره جلّ في علاه فإليه ينسب الفضل كله في إكمال هذا العمل وبعد .
أتقدم بوافر شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة
لإتاحتهم الفرصة لأكمال دراستي العليا وماقدموه لي من العون والمساعدة.

وأتوجه إلى أستاذي الدكتور مثنى محمد إبراهيم المهداوي و أستاذتي الدكتورة أسيل كاظم هادي
الأنباري- المشرفان على رسالتي - بالشكر والتقدير الذي لم تفهم أي كلمات حقهم فلولا دعمهم
الكبير ماتم هذا العمل، فجزاهم الله تعالى ما هو أهله وبارك الله لهم في وقتهم وعمرهم وعملهم وإلى
مزيد من التميز والرقى والنجاح إن شاء الله .

ومن باب الوفاء والإخلاص والاحترام أتقدم بشكري الى أستاذتي الذين قدموا لي المعروف بكل
نفس راقية وطيبة .

ومن أي أبواب الثناء أدخل لمن غمرتني بحبها أُمي سأظل شاكره لكي ما حييت انتي من تجرعتي
كأس الشقاء مرا ليسقيني رحيق السعادة ... يا من ضحت بالكثير من اجل ان أحيا... ومهما شكرت
فلن استطيع أن أكمل ليس تهاوناً ولكن لك في نفسي شيء اعمق من ذلك.

وأقدم بجزيل الشكر والتقدير الى اخوتي وخاصة (ضحى) لما لهى من فضل ومسانده لي طيله مدة
دراستي فقد غمرتني بحبها ومساعدتها لي ... لكم مني كل الحب والمودة.

شكري وتقديري الى رفاق دربي والسحابة المعطاء الى جميع صديقاتي وزملائي اللذين تحملوا
الكثير من أجلي واسهموا في مساعدتي بدون مقابل (سحر كاظم ، ضحى صباح ، نغم عماد ، إيمان
محسن ، رشا كفاح ، ايناس عمار)

ايناس

الإهداء

إلى من أضاء بعلمه عقل غيره .. صاحب الاسراء والمعراج .. إلى من كلله الله بالخلق العظيم إمام المرسلين.

(النبي محمد عليه الصلاة والسلام)

منك تعلمنا أن للنجاح قيمة ومعنى .. ومنك تعلمنا كيف يكون التفاني والإخلاص في العمل .. ومنك
أما ان لامستحيل في سبيل الإبداع والرقى "أساتذتي الأفاضل"

إلى من اشتروا لنا ليلاً آمناً بدمائهم الطاهرة ..

إلى أرواح في السماء ترزق عند الله " شهداء العراق "

إلى من كلل العرق جبينه ... وشققت الأيام يديه ... إلى من علمني أن الأعمال الكبيرة لا تتم إلا
بالصبر ... رحمه الله وجعله من الشهداء المكرمين ، والدي الشهيد " جاسم إبراهيم كاظم "

إلى شمس أذابت جمود قلبي وَفَجَّرَتْ ينابيع الأمل ... يا من أضاءت بنورها ظلام عقلي وفتحت لي
طريقاً في الحياة ... إلى من غرست حب الله في فؤادي " أمي الغالية "

إلى سندي وقوتي وملاذي بعد الله " زوجي "

إلى الابتسامة اللطيفة التي شقت بجمال نورها ظلام قلبي فمسحت مابه من هموم ... إلى تلك
اللمسة الحانية التي فَجَّرَتْ في قلبي ينبوعاً من الأمل في هذه الحياة القاسية ... " أخواني "

إلى فلذات كبدي وقرة عيني أولادي "

إليكم لروعة أخلاقكم وتميزكم الملحوظ وحضوركم الراقي والابتسامة الدائمة " زملائي "

ايناس

إقرار المشرف

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (إستخدام تقنية الـ RAPD في تحليل التغيرات الوراثية لأنسال كالس مزارع المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر *Stevia rebaudiana* Bertoni) التي قدمتها الطالبة (إيناس جاسم إبراهيم) قد جرت تحت إشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى, وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

المشرف : أ.م. د. مثنى محمد ابراهيم

التوقيع:

المشرف: أ.م.د. أسيل كاظم هادي

التاريخ :

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: أ.م. د. ذكري عطا ابراهيم

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2021

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (إستخدام تقنية الـ RAPD في تحليل التغيرات الوراثية لأنسال كالس مزارع المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر) *Stevia rebaudiana* (Bertoni) التي قدمتها طالبة الماجستير (إيناس جاسم إبراهيم) روجعت لغوياً وصُحِّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. لؤي صيهود فواز التميمي

التاريخ: / / 2021 م

إقرار الخبير العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (إستخدام تقنية الـ RAPD في تحليل التغيرات الوراثية لأنسال كالس مزارع المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر (*Stevia rebaudiana* Bertoni) التي قدمتها طالبة الماجستير (إيناس جاسم إبراهيم) قسم علوم الحياة قد تم مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : أ.د. إحسان عرفان حسين

التاريخ : / / 2021 م

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة، بأننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (إستخدام تقنية الـ RAPD في تحليل التغيرات الوراثية لأنسال كالس مزارع المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر (*Stevia rebaudiana* Bertoni))، وقد ناقشنا الطالبة (إيناس جاسم إبراهيم) في محتوياتها وفيما لها علاقة بها، ونعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة بتقدير () .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة :

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة :

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2021

عضواً مشرفاً

التوقيع :

الاسم :أ.م.د. اسيل كاظم هادي

المرتبة العلمية:

التاريخ : / / 2021

عضواً مشرفاً

التوقيع :

الاسم :أ.م.د. مثنى محمد أبراهيم

المرتبة العلمية:

التاريخ : / / 2021

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

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 الشكل Polymorphic band ولم تظهر حزم احادية الشكل Monomorphic band. سجل النسل 20 أعلى قيمة للـ Steviosid 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 ، وبلغت 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 .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
الفصل الأول – المقدمة		
3-1	المقدمة	1
الفصل الثاني – إستعراض المراجع		
17-4	استعراض المراجع	2
4	التصنيف النباتي لنبات ستيفيا .	1- 2
5-4	الموطن الاصلي والانتشار.	2- 2
7-6	أهمية نبات ستيفيا Stevia	3- 2
9-7	الاختلافات الوراثية في المزارع النسيجية	4- 2
10-9	تقنية PCR واستخدامها في معرفة التغيرات الوراثي	5- 2
13-10	التقنيات المعتمدة على الـ PCR	6-2
11	Inter Simple Sequence Repeat Markers (ISSR)	1-6-2
11	Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP)	2-6-2
13-12	Random Amplified Polymorphic DNA Markers (RAPD)	3-6-2
14-13	التقنية التي لا تعتمد على الـ PCR	7-2
17-14	المركبات الفعالة في نبات ستيفيا	8-2
الفصل الثالث – المواد ، وطرائق العمل		
18	المواد وطرائق العمل	3
18	الأجهزة المستعملة في هذه الدراسة .	1- 3
18	المواد المستعملة في هذه الدراسة .	2- 3
19	طرائق العمل	3-3
19	مصدر نبات ورق السكر	1-3-3
20 -19	تحضير الأوساط الغذائية	2-3-3
21	إدامة أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .	3-3-3

21	الدراسة الجزيئية	4-3
22	إستخلاص الـ DNA	1-4-3
23	قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الدنا	2-4-3
23	تحضير البادئات العشوائية لتقانة RAPD	3-4-3
25-23	تضاعف دنا العينات النباتية مع البادئات العشوائية باستعمال جهاز PCR	4-4-3
26	الدليل الحجمي DNA Ladder	5-4-3
27	ترحيل العينات كهربائياً Electrophoresis	6-4-3
27	المحاليل : Solutions	7-4-3
27	تحضير الأكاروز Preparation of agarose	8-4-3
27	صب هلام الأكاروز الأفقي Casting of the horizontal agarose	9-4-3
28	تحميل الدنا DNA Loading	10-4-3
28	تحليل نتائج RAPD	11-4-3
29-28	تقدير محتوى الستيفوسايد Steviosid في أوراق نبات ستيفيا وكالس الورقة ومعلقاتها الخلوية ، بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	5- 3
29	تحضير العينات	1-5- 3
29	إستخلاص وفصل الستيفوسايد باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC .	2-5-3
32-30	التشخيص والتقدير الكمي للستيفوسايد Stevioside بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC .	3-5- 3
الفصل الرابع – النتائج والمناقشة		
59-33	النتائج والمناقشة	4
44-33	نتائج تفاعلات RAPD	1-4
48-44	العلاقات الجينية بين الاشكال الجينية لنبات الستيفيا بواسطة تقنية RAPD	2-4
56-48	التشخيص والتقدير الكمي لمحتوى Steviosid بأستخدام تقنية (HPLC)	3-4

50-48	اوراق نبات ستيفيا	1-3-4
51	عينة الكالس	2-3-4
56-52	محتوى Steviosid في الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية	3-3-4
الفصل الخامس – الإستنتاجات والتوصيات		
58-57	الاستنتاجات والتوصيات	5
57	الاستنتاجات	1-5
58	التوصيات	2-5
72-59	قائمة المصادر	
60-59	المصادر العربية	
72-61	المصادر الأجنبية	
I	الخلاصة	

قائمة الجداول

ت	العنوان	رقم الصفحة
1	مكونات الوسط الغذائي MS (Murashige و Skoog، 1962)	20
2	مكونات G2 – Green master mix	24
3	البادئات العشوائية المستعملة في تقنية RAPD	24
4	مكونات خليط تفاعل PCR – RAPD	25
5	مراحل التفاعل التضاعفي في جهاز البلمرة المتسلسل .	25
6	ظروف تشخيص النماذج القياسية من Stevioside والمركبات المفصولة من العينات المنتخبة	31
7	الحزم الناتجة من تضاعف البادئ P-168904 لعينات النبات المدروسة مع أوزانها الجزيئية	33
8	الحزم الناتجة من تضاعف البادئ P-168906 لعينات النبات المدروسة مع أوزانها الجزيئية .	35
9	الحزم الناتجة من تضاعف البادئ sigma-5383-043 لعينات النبات المدروسة مع أوزانها الجزيئية.	38
10	الحزم الناتجة من تضاعف البادئ sigma-5383-064 لعينات النبات المدروسة مع أوزانها الجزيئية .	40
11	الحزم الناتجة من تضاعف البادئ sigma-5383-091 لعينات النبات المدروسة مع أوزانها الجزيئية .	42
12	مصفوفة قيم البعد الوراثي بين الأنماط المدروسة	46
13	العدد الإجمالي ونطاق الحجم للمناطق المضخمة التي تم الحصول عليها لكل بادئ من طريقة RAPD .	47
14	زمن احتباس مركب Steviosid المعزول ونسب وجوده في عينات نبات ستيفا	49

قائمة الاشكال

ت	العنوان	رقم الصفحة
1	الشكل العام لنبات الستيفيا <i>Stevia rebaudiani</i> (Treben، 2000)	5
2	مركب الستيفيول ثنائي التربين	15
3	مسلك MEP) Methylerythritol- 4-phosphate (لبناء الحيوي للستيفيول في اوراق نبات ستيفيا	16
4	مراحل نمو وتطور الخطوط الخلوية لقطع كالس	21
5	الدليل الحجمي DNA Ladder 100bp	26
6	المنحنى القياسي لمركب Steviosid للعينة القياسية	32
7	مخطط شجرة القرابة الوراثية الذي يوضح العلاقات الجينية بين الاشكال الجينية لنبات الستيفيا .	45
8	منحنى Steviosid لعينة ورقة نبات الام	50
9	منحنى Steviosid لعينة كالس المستحث من اوراق نبات <i>Stevia rebaudiana</i>	51
10	منحنيات مركب Steviosid في أنسال الكالس المشتق من مزارع المعلقات الخلوية . (A) : الكالس رقم 4 (B) : الكالس رقم 13 (C): الكالس رقم 15	53
11	منحنيات مركب Steviosid في أنسال الكالس المشتق من مزارع المعلقات الخلوية . (: الكالس رقم 6 (A): الكالس رقم 10	54
12	منحنيات مركب Steviosid في أنسال الكالس المشتق من مزارع المعلقات الخلوية . (A): الكالس رقم 16 (B): الكالس رقم 20	55

قائمة الصور

رقم الصفحة	العنوان	ت
34	نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ P-168904 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة 60 دقيقة . إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (1) عينة الورقة ، (c) كالس الورقة ، (25-1) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .	1
36	نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ P-168906 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة 60 دقيقة . إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (c) كالس الورقة ، (25-1) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .	2
39	: نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-043 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة 60 دقيقة . إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (c) كالس الورقة ، (25-1) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية.	3
41	نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-064 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة 60 دقيقة . إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (C) كالس الورقة ، (25-1) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية	4
43	نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-091 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة 60 دقيقة . إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (c) كالس الورقة ، (25-1) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .	5

المختصرات

bp	Base pair	زوج قاعدي
BA	Benzyl Adenine	البنزائل ادينين
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid	الدنا
Kin	Kinetin	الكينتين
MS	Murashige and Skoog medium	وسط موراشيج و سكوج
NAA	Naphthalene Acetic Acid	نفتالين حامض الخليك
PCR	Polymerase chain reaction	التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا
pH	Potential of Hydrogen	الاس الهيدروجيني
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا
TDZ	N-phenyl-N 1,2,3-Thidiazuron	الثياديازورون
NaCl	Sodium Chloride	كلوريد الصوديوم
UV	Ultra Violet	الاشعة فوق البنفسجية
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء
TE	Tris-EDTA buffer solution	محلول TE
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates	ديوكسي نكليوتيد ثلاثي الفوسفات
D.W	Distilled water	ماء مقطر أيوني

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 أو Sweet 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 شيوعاً منها *S.ovata* و *S.plummerae* و *S.rebaudiana* و *S.salicifolia* و *S.serrista* وأكثرها حلاوة هو *Stevia rebaudiana* Bertoni (Beement وآخرون، 2012). يبلغ إرتفاع النبات حوالي 60-70 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 جنسياً أمراً صعباً، وذلك لأن أزهار هذا النبات غير متوافقة ذاتياً (Yadav وآخرون 2014). إضافة إلى إختلاف التركيب الوراثي للنباتات الناتجة من البذور مما 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 آلاف النباتات في اقل من سنة (Devi، 2003).

ولنبات Stevia أهمية من الناحية الطبية والإقتصادية إذ تعد أوراقه مصدراً لكلوكوسيدات التربينات الثنائية مثل Steviolbioside و Rebaudioside A,B,C,D,E و Rubsosite و Dulcoside و Stevioside (Starratt وآخرون، 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-Estevéz وآخرون، 2001 و Andrade وآخرون، 2009). ويمكن الإستفادة من مزارع المعلقات الخلوية من خلال الزيادة في إنتاج مركبات الأيض الثانوي، والمركبات الصيدلانية بالإضافة الى إستثمار المال والوقت الأزم للإنتاج (Davies و Derolles، 2014).

تعتبر مؤشرات الدنا من أوسع الأدوات في الكشف عن التغيرات على المستوى الجزيئي. ومن تقاناتها الـ RAPD وهي من التقانات التشخيصية وتعتمد على عدد البودئ المستخدمة ، والتي تعطي مؤشر على بعض الفوارق بين العينات بالإعتماد على عدد الحزم الناتجة ، في حين تتعامل الدراسات المظهرية والتشريحية والكيميائية 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 مكملتها على شريط الدنا وذلك للارتباط به ومضاعفته ، حيث يتكون من هذا التضاعف قطع من الدنا تكون مختلفة الأطوال والأعداد اعتماداً على عدد مواقع الارتباط 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 التغيرات الوراثية في أنسال الكالس الناتج من زراعة المعلقات الخلوية لنبات Stevia عن طريق تقانة RAPD – PCR وتحديد التباعد الوراثي بينها .
- 3- الكشف والتقدير الكمي لمركب Stevioside في أنسال الكالس الناتجة بتقنية HPLC ومقارنة الاختلافات في كمية مركب Steviosid في الأنسال مع قيم البعد الوراثي لها .

1-2:التصنيف النباتي لنبات ستيفيا .

Kingdom Plantae (Plants)

Sub kingdom Tracheobionta (Vascular plants)

Super division (Seed plants) Spermatophyta

Division (Flowering plant) Magnoliopsida

Sub class Asteridae

Order Asterales

Family (composetae) Asteraceae

Genus *Stevia*

Species *rebaudiana* Bertoni

(Yavad وآخرون، 2011)

2-2: الموطن الاصلي والانتشار.

يعد نبات الاستيفيا واحدة من النباتات الذي تطرقت العديد من الدراسات الحديثة الى اهميته لصحة الانسان وتغذيته ، يضم هذا الجنس 240 نوعاً من شجيرات مزهرة، ينتمي الى العائلة المركبة Asteraceae، يطلق عليه العديد من اسماء منها الورقة العسلية، ورقة باراجواي الحلوة أو الورقة السكرية ، الإسم العلمي لها *Stevia rebaudiana*، يتواجد النبات وينمو في الأجزاء المدارية من أمريكا الشمالية والجنوبية وموطنها شمال أمريكا الجنوبية ، وهي عشبة معمرة دائمة الخضرة ، يبلغ ارتفاعها متر واحد ، إذ تنمو في مرتفعات على الحدود ما بين البرازيل والباراجواي، وفي الوقت الحاضر انتشرت زراعتها في مناطق عديدة من العام كأمریکا الوسطى والصين وتايلاند وفلسطين (Suanarunsawat وآخرون، 2004). (شكل 1)



الشكل (1): الشكل العام لنبات الستيفيا *Stevia rebaudiana* (Treben, 2000)

2-3: أهمية نبات ستيفيا

لقد إرتبط إستهلاك المشروبات بالسكر بمخاطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية وغيرها من الحالات المرضية الفسيولوجية مثل السمنة أو داء السكري ، ونظراً للوعي المتزايد بهذه الحقيقة تعمل الصناعات الغذائية على تطوير منتجات جديدة لتقليلها كمية السكر المضاف في تطوير المنتجات الغذائية (Peng وآخرون ، 2018) . في عام 1899 كان عالم النبات Bertoni أول من وصف ستيفيا (Rasenack، 1908) وقد أشار الى إحتواء النبات العديد من المحليات وإن النبات ذو قيمة علاجية على مستوى النباتات الاستوائية والمدارية. يتم استخراج كلايكوسيدات الثنائية البلورية الحلوة من اوراق ستيفيا والذي يدعى Steviosid ، ان الستيفوسيد النقي المستخرج يعد احلى 300 مرة من السكر المعتاد وهو مستقر في درجة حرارة عالية ودرجة حموضة تتراوح بين 3-9 ، كما يمتاز بصفات طبيعية اخرى فهو لا يغير اللون ويحافظ على ثبات الحرارة في درجة 100 م° وتتميز بعمر تخزيني طويل، وتعتبر من المحليات التي تضاف الى القهوة والاطعمة المصنعة والمشروبات، ويعتبر Steviosid مركب ذو أهمية للأشخاص المصابين بداء السكري ومن لديهم اعراض ارتفاع السكر في الدم وكذلك اصحاب النظام الغذائي (kantia و kothari ، 2002) .

منذ 20 عاماً استهلك الملايين من سكان البركواي والبرازيل مختلف الخلاصات المصنعة من اوراق الستيفيا إذ يمتاز النبات بالعديد من الاستخدامات الطبية كالحاد من نمو البكتريا في الفم إذ أُضيفت كعشبة لمعاجين الاسنان لتعزيز صحة الفم (Kurek و Krejpcio ، 2019 و Salehi وآخرون، 2019) . ولها اهمية أيضا في استخداماها موضعيا للأمراض الجلدية كالاكزيما والتهاب الجلد، مما جعلها خيارا طبيعيا (الطب البديل) لشفاء الكثير من الناس المصابين بتلك الامراض (Jayaraman وآخرون، 2008) . وقد اعتمدت شركة كوكاكولا المشهورة على نبات ستيفيا لتحلية منتجاتها من المشروبات الغازية بدلا من مادة السُكرين (Sacchrin) أو النوترا سويت (Nutra sweet) (Choi وآخرون، 2002) .

كما يمكن للذين يقومون بالحمية من تناول الأوراق نفسها لأنها مادة قليلة السعرات الحرارية وهي مكملا جيدا للطعام، إذ تتميز المواد المحلية فيه بأنها ذات سعرات حرارية منخفضة جدا وبذلك

فأنها لا تؤثر على الافراد الذين يتناولون الحلويات المصنوعة منها، لذى سوف تزيد من فرص فقدان الوزن لديهم وبنجاح (Mizutani و Tanak ، 2002). ويحتوي نبات الستيفيا أيضا على مركبات مضادة للأكسدة مثل كيرسيتين، كايمبرول ومركبات الكلوكوسيدات الاخرى والتي تعد كمكملات للوجبات الغذائية المثالية للوقاية من السرطان والقضاء على الجذور الحرة في الجسم ومنعها من تحويل الخلايا السليمة الى خلايا سرطانية، وتعمل مضادات الاكسدة أيضا على منع الشيخوخة المبكرة ومنع الاصابة بأمراض القلب (Ma و Yan، 2009).

2-4: الاختلافات الوراثية في المزارع النسيجية

ان نمو خلايا النبات خارج الجسم الحي وتحولها الى نبات كامل هي عملية غير جنسية تتضمن الانقسام الخيطي للخلية فقط ، عليه فمن المتوقع ان تكون نواتجها نباتات متماثلة التركيب الوراثي ، إلا ان هناك اختلافات وراثية قد تحدث نتيجة اكاثر هذه النباتات من خلال اعادة تمايز نسيج الكالس ، إذ يعد حدوث تباينات غير مسيطر عليها خلال تكون الكالس موضوعا متوقعا بل وغير مرغوب فيه في بعض الاحيان التي تتطلب ثباتاً وراثياً. وكونت مثل هذه الاختلافات الجسمية قاعدة للاختلافات الوراثية بين النباتات الناتجة (الصميدعي، 2017).

إن من أهم التطبيقات الرئيسية والكبيرة لتقنية زراعة الانسجة هي تقنية الاكاثر الدقيق (Smith، 2013) ، إذ لوحظت في النباتات المكثرة بهذه الطريقة ظواهر عدم الثباتية الكروموسومية وتباينات مظهرية واختلافات في الصفات الحقلية. ونتيجة لذلك زاد الاهتمام لاكتشاف هذه التباينات من خلال زراعة انسجة النبات من اجل ادخال تحسينات على نباتات المحاصيل المختلفة، ففي عام 1981 م أطلق Larkin و Scowcroft مصطلح الإختلافات في جسم السلالة الخضرية (Somaclonal variation) على ظاهرة الاختلافات التي تحصل في الاخلاف الناشئة من مزارع الخلية ويطلق هذا المصطلح عالميا أيضا على التباينات التي تحصل تلقائياً أو جراء تدخل الانسان خلال استخدام الخلايا الجسمية. (الصميدعي، 2017).

يعرف التنوع الوراثي على انه الاختلافات الموجودة بين الافراد أو المجتمعات الحية التي تعود الى نوع معين والتي تتكون بتأثير البيئة المحيطة والانتخاب الطبيعي، واحيانا تحصل نتيجة عمليات التربية والتحسين (حسين ، 2015).

برزت فكرة استعمال العلام الوراثية لدراسة التقارب الوراثي للتغلب على مشكلة الاختلافات الوراثية والبيئية الكبيرة التي توجد بين الاصناف وذلك لوجود الكثير من الاسماء لنفس التركيب الوراثي والذي ادى الى الصعوبة في التمييز بين الاصناف المختلفة ، لذلك تم استخدام مجموعة من العلام الوراثية من قبل الباحثين في توصيف الصنف وراثيا وتمييزه عن الاصناف الاخرى كمؤشرات RAPD ، AFLP ، ISSR ، STS ، SSR ، وغيرها ، إذ اعتمدت المؤشرات المورفولوجية Morphological markers في المراحل الأولية في مثل هذه الدراسات ، ومن ثم استخدمت مؤشرات بيوكيميائية Biochemical markers والتي تعتبر كنواتج تعبير مورثي معين، وفي اوائل الثمانينيات ظهرت المؤشرات الجزيئية Molecular markers التي تعتمد على تجارب الحامض النووي الدنا (اشتر، 2008) .

إن الاختلاف في عدد الحزم الناتجة من البادئات العشوائية المستخدمة يعتمد على مدى توافق ارتباط البادئ بالجينوم النباتي ، إذ ان وجود اي إختلاف في تسلسل القواعد النيتروجينية للبادئات المستخدمة يؤدي الى اختلاف مواقع ارتباط مع جينوم النبات المدروس، مما يؤدي إلى تباين في أعداد الحزم الناتجة من البادئات المستخدمة (Vos وآخرون، 1995). لذلك عند حدوث اي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة الحذف Deletion او الاضافة Insertion أو إعادة ترتيب Rearrangment للنيوكليوتيدات في جينوم النباتات المدروسة أيًا كانت الأسباب كالتغيرات النقطية Point mutations او التغيرات في الهيئة الكروموسومية Chromosomal karyotypic change أو الارتباط أو العبور الجسمي Somatic crossing over او بلمرة الدنا DNA Amplification او مثيلته DNA Methylation او التغيير في دنا العضيات Change in organelles DNA او وجود ما يعرف العناصر القابلة للإنقال Transposable elements ، سوف يؤدي الى تغييراً في مواقع الارتباط بالبادئ، مما يؤدي الى تغيير في حجم القطعة المتضاعفة

وبهذا يسبب ظهور حزمًا متباينة، أو عدم ظهورها في مواقع محددة على الهلام (Jain و Brar ، 1998).

2-5: تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR واستخدامها في معرفة التغيرات الوراثية

يعد الدنا المادة الأساس في أغلب الدراسات الجزيئية وإن مؤشرات هذا الحامض هي من أفضل الطرائق لتحديد الاختلاف الوراثي ورسم الخارطة الوراثية وتحديد الأصول الوراثية (Ullah وآخرون ، 2013). وأشار Kumar و Verma (2012) إلى إن مؤشرات الدنا مفيدة جداً في تحديد التغيرات في مراحل مبكرة من النمو ، ولها القدرة على الكشف عن مئات المواقع (Loci) وبآليات متعددة للموقع الواحد وتتميز عن طرق التشخيص المظهرية والانزيمات المتناظرة بأنها لا تتأثر بالبيئة وتتميز بسرعتها ولا تحتاج إلى عينات بكميات كبيرة لتنفيذها (Han وآخرون ، 2001). ومن أهم الحقائق العلمية التي جعلت تقانة الـ PCR مفيدة هي اختلافات المادة الوراثية من كائن حي إلى آخر وهي من الصفات الفريدة الموجودة فقط ضمن أصناف النوع الواحد وبذلك يمكن تتبع المادة الوراثية ومعرفة أصلها. تعتبر تقنية PCR واسعة الاستخدام ، إذ تستهدف جزء معين من شريط الدنا ومضاعفته للحصول على كمية كبيرة من العينة الصغيرة الحجم ، إذ يتم مضاعفة الدنا خارج الجسم الحي *in vitro* بالاعتماد على ارتفاع وانخفاض درجات الحرارة لمسح جزء معين منه وتضخيمه ، ويمكن اعتبار هذه التقنية بأنها ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الدنا أثناء الانقسام الخلوي. ويمكن الحصول على النسخ المتعددة من الدنا خلال 3 ساعات بواسطة تقنية PCR، في حين يستغرق الحصول على الكمية نفسها عن طريق الاستنساخ الحاصل في الخلية نحو أسبوع. وعلى عكس عملية تضاعف الحامض النووي في الطبيعة إن استنساخ الدنا بتقانة PCR لا يشمل التسلسل الكامل لجزيئات الحامض النووي الأصلي بل يقتصر ويستهدف منطقة جزيئات الحامض النووي القالب المحدد والقصير نسبياً (Lipp وآخرون ، 2005). وذكر Dholakia وآخرون (2001) أن تفاعل PCR هو تفاعل قوي للتحليل الجيني لأنه يمتاز بسهولة في التعامل والقدرة على إعطاء أفضل مستوى من التعدد المظهري Polymorphism

وذكرت اشتر (2008) إلى إن تفاعل الـ PCR يتمتع بعدة ميزات :

- 1- يحتاج الى كمية قليلة من الحامض النووي .
- 2- اغلب المواد المشتقة منه لا تحتاج الى استعمال المواد المشعة .
- 3- لا تحتاج الى تجهيزات مختبرية كبيرة .
- 4- لا تحتاج الى معرفة سابقة بالدنا وذلك لمعظم التقانات المشتقة منه.

وتختلف هذه المميزات بالزيادة والنقصان وذلك تبعاً للتقانات المستخدمة المشتقة من هذا التفاعل نتيجة للتطور الحاصل في تقانة PCR والتي تعتمد على هذا التفاعل كمؤشرات RFLP ، RAPD ، SSRI و AFLP وغيرها، إذ تمتاز كل تقانة منها بامتلاكها ميزات ونقاط ضعف خاصة، لذلك فأن قرار اختيار التقانة المناسبة هو مهم للوصول الى الهدف المطلوب (حمد الله، 2009).

2-6 : التقنيات المعتمدة على الـ PCR :

إن تطور المؤشرات الجزيئية بشكل كبير وواسع وتعدد أنواعها والمبادئ التي تعتمد عليها بالإضافة الى إستعمالاتها وتطبيقاتها ، إذ تتميز بخصائص عديدة (البطل وآخرون ، 2011) منها:

- 1- التباينات التي تُكشف بإستعمال البادئات الجزيئية ناتجة عن تغيير بالتركيب النيكلوتيدي لجزيئة الدنا غير المتأثرة بالظروف البيئية .
- 2- نتائجها لا تتأثر بعمر ونوع النسيج النباتي المستعمل في الدراسة وإمكانية إجراء الدراسة الجزيئية في أي طور من أطوار النمو .
- 3- إمكانية الحصول على النتائج بسرعة ودقة في كثير من الأحيان .
- 4- لها قدرة الكشف عن التباينات الوراثية بنسبة أكبر .

تختلف المؤشرات المعتمدة على دراسة الدنا عن بعضها البعض بنوع التباينات الوراثية التي تكشفها ومن هذه المؤشرات :

2-6-1 : تكرار التسلسل البسيط المتداخل Inter Simple Sequence

Repeat Markers (ISSR)

هي تقنية تستخدم لتسلسل التتابع الترادفية الصغيرة في سلسلة البوليمرايز (Reddy وآخرون ، 2002) ، وتستخدم على نطاق واسع في التصنيف والمقارنة المنهجية (Nilkanta وآخرون ، 2017 و Amom وآخرون ، 2018) والعلاقات التطورية للأنواع وتحديد الأصناف الجينية (Mohamad وآخرون ، 2017) وتتميز بالبساطة والسرعة وذات أسعار معقولة (Ragi وآخرون ، 2018) وهي مؤشر شبه عشوائي يتم تضاعفه بواسطة الـ PCR بوجود بادئ واحد متمم لمناطق الهدف (Bornet و Branchard ، 2001) ، يتراوح طوله (16-20) قاعدة نروجينية بإستطاعته إستهداف الـ DNA القالب وذو قابلية عالية على التكرار (Reddy وآخرون، 2002).

2-6-2 : التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة Amplified

Fragment Length polymorphism (AFLP)

تقنية لها مزايا عديدة مقارنة بالتقنيات الأخرى والقائمة على المؤشرات الجزيئية إذ لها القدرة على توليد باندات عالية من التعدد الشكلي ، دون المعرفة بتسلسل الحمض النووي (Sorkheh وآخرون ، 2007) ، تعتمد هذه التقنية على التضخيم الإنتقائي للقطع المحددة للجينوم بواسطة PCR (Dhutmal وآخرون ، 2018) إذ تم إستخدامها بنجاح في العديد من الدراسات لأخذ البصمات ، ودراسة التنوع الجيني ، والعلاقات التطورية ، والإستقرار الوراثي في العديد من الأنواع النباتية مثل (شجرة الكاري) *Murraya Koenigii* التي تنمو في شرق آسيا (Ghosh و Mandi ، 2018) .

3-6-2: التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Random

Amplified Polymorphic DNA Markers (RAPD)

من بين العديد من المؤشرات الجزيئية القائمة على الحامض النووي هي تقانة الـ RAPD التي تم توظيفها بنجاح لتقييم الإستقرار الجيني للنباتات المجددة في المختبر (Lakshmanan وآخرون ، 2007 و Senapati وآخرون ، 2013) إذ تتميز بالسرعة والفعالية العالية (Samantaray و Maiti ، 2010 و Bhatia وآخرون ، 2011 و Robarts و wolfe ، 2014) .

تتضمن تقانة الـ RAPD مضاعفة لقطع محددة من الدنا للحصول على الحامض النووي بكمية كافية تسمح برؤيتها بوضوح تحت الأشعة فوق البنفسجية وذلك للمقارنة بين الأفراد قيد الدراسة (الجبوري وآخرون ، 2009). إذ أشار حسين (2011) إن هذه التقانة تعتمد على إكثار قطع الدنا النباتية في تسلسلها النيكلوتيدي عشوائياً بتضخيم قطع الدنا الحاوية على قواعد نيكلوتيديّة متتالية والتي يمكنها أن تتكامل مع البادئات العشوائية في نهاياتها ، ويمكن الكشف عن النتائج عن طريق الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز (Khouildi وآخرون ، 2002 و Abdel-Mawgood وآخرون ، 2010) .

أصبح لتقانة RAPD العديد من التطبيقات في مجال المؤشرات الجزيئية ، إذ استخدمت في تحديد العلاقة الوراثية بين العوائل النباتية والأجناس والأنواع وذلك لأهميتها في برامج التربية والتحسين للأنواع النباتية إذ استخدمت في تحديد العلاقة الوراثية بين أنواع جنس المانكو *Mangifera* (Anand ، 2006) ونبات الكافور والقرفة (Sulange وآخرون ، 2007) والورد (حسين وجنان ، 2011) والحمضيات (Al-Anbari وآخرون ، 2014) والفاصوليا (Bukhari وآخرون ، 2015) والتكي الأبيض (Saha وآخرون ، 2016) وثمار النخيل الزيتية (Odenore وآخرون ، 2018) والعليق الأسود (Borsai وآخرون ، 2020) وأصناف الكرنب (Islam وآخرون ، 2020) ، إذ أكد Vidal وآخرون (2000) الى انه تم إبعاد النباتات المتقزمة غير الممثلة لصنف الموز الأصلي بالاعتماد على تفاعلات الـ RAPD .

وأشار Hanacek وآخرون (2002) الى انه بالإمكان زيادة التغيرات الوراثية في النباتات المكثرة نسيجياً باستخدام المطفرات والكشف عنها بتقانة الـ RAPD . إذ أكد Viloria (2002) استخدامه هذه المؤشرات لملاحظة التغيرات الوراثي لنباتات الليمون المكثرة نسيجياً ، كما استخدمت في توصيف انواع الحمضيات المكثرة نسيجياً وتحديد العلاقة الوراثية بينها (Bastianel وآخرون، 2006) . ومن الإستخدامات الأخرى لتقانة الـ RAPD والتي أكدها Razani وآخرون (2020) أظهرت تغييراً مورفولوجياً بين أطوال شتلات نبات الموز المكثرة نسيجاً ، كما أوضح Phillips وآخرون (1994) ان الاختلافات الوراثية في السلالة الخضرية تحدث غالباً استجابة نتيجة الشد الذي يتعرض له النبات تحت ظروف الزراعة خارج الجسم الحي . في البحوث السابقة مثل Modi وآخرون (2012) و Singh وآخرون (2014) أكدت أن تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بأنها اداة جزيئية ذات فائدة كبيرة لتأسيس الاستقرار الجيني للأصناف وكذلك نباتات ستيفيا المعاد تجديدها قي المختبر ، كما أشارت نتائج Moktaduzzaman و Rahman (2009) أن عينات الأسستيفيا المكثرة نسيجياً أنتجت نباتات بعضها كانت متشابهة 100% مع نبات الأم وبعضها الآخر متشابهاً 14% وقد يرجع السبب الى إختلاف في ظروف المختبر

2-7 : التقنية التي لا تعتمد على الـ PCR :

• تغيير قطع التقييد لتفاعل البلمرة المتسلسل Restriction

Fragment Length Polymorphism (RFLP)

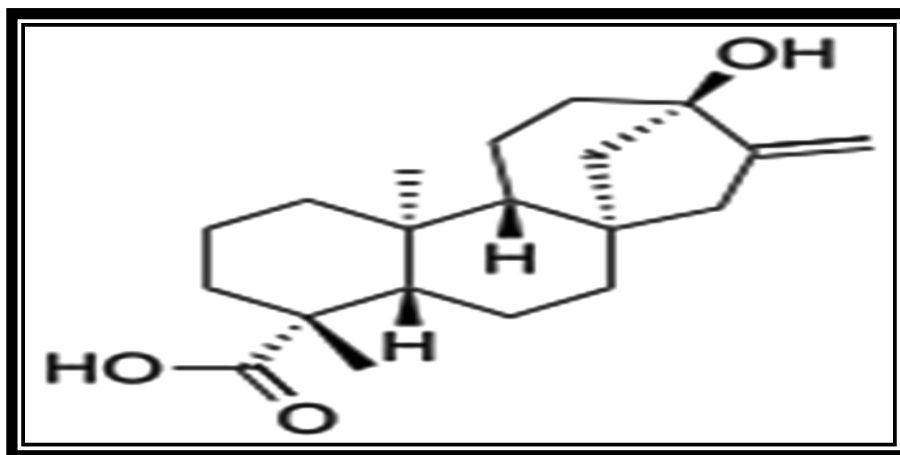
تستعمل هذه التقنية في مجال الوراثة الجزيئية يتم فيها هضم الدنا بأنزيمات الحصر والتقييد Vestrictive enzymes يتم التعرف من خلالها على تتابعات معينة ونقطيعها في مواقع محددة على شريط الدنا لتنتج قطع طويلة محددة مختلفة الأحجام حسب عدد القواعد النيتروجينية الداخلة في تكوينها لذى سوف تزداد كفاءتها مع زيادة عدد أليلات الموقع الجيني الواحد (حمد الله ، 2009) . تعتبر هذه التقانة من الطرق

البسيطة التي تمتاز بقصر وقتها وعدم إحتياجها الى معرفة تتابع الدنا للكائن الحي لتصميم البادئات الخاصة به (السنجري ، 2009).

2-8 : المركبات الفعالة في نبات ستيفيا

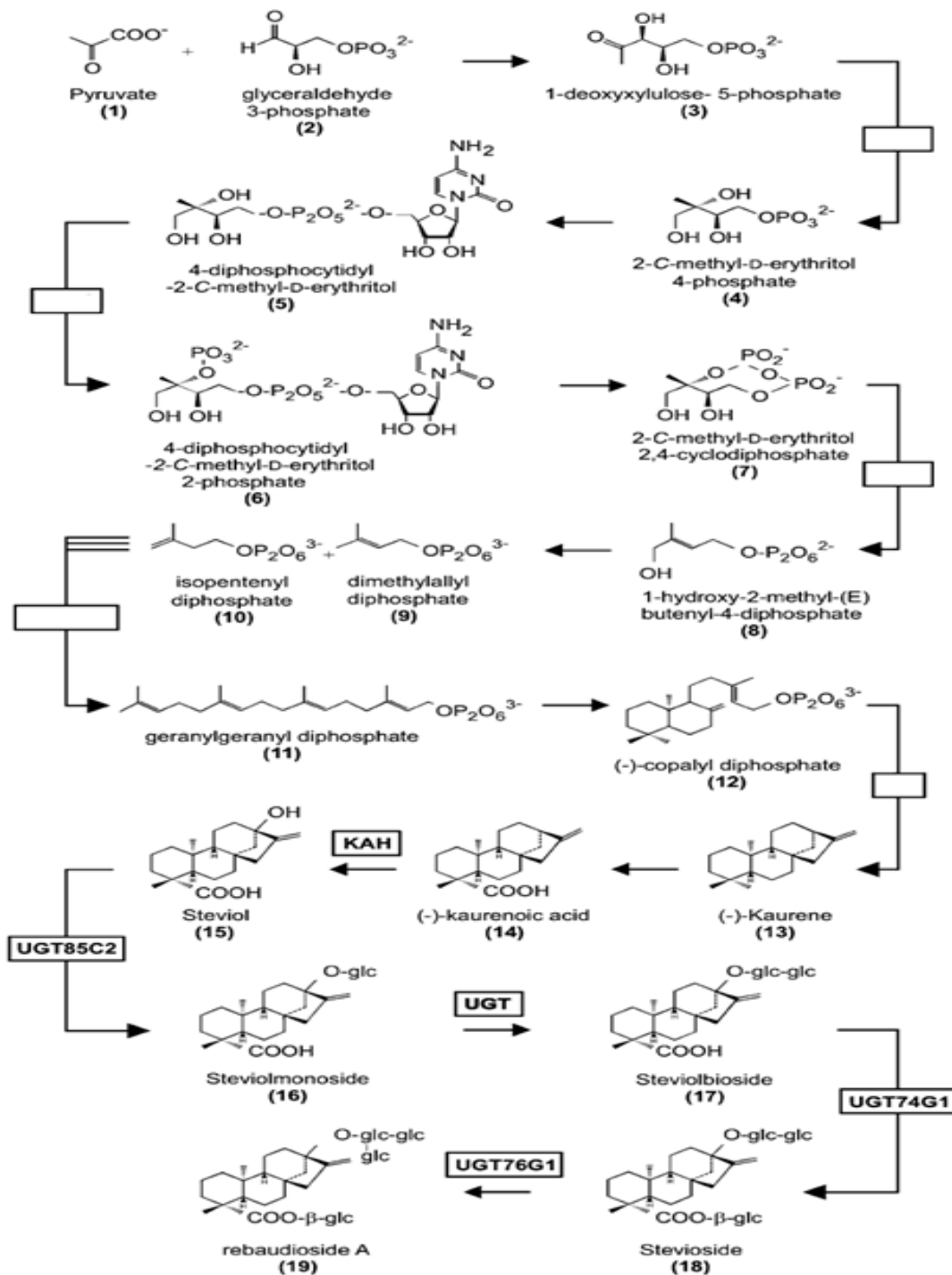
تعد اوراق نبات الستيفيا مصدراً لكلوكوسيدات التربينات الثنائية مثل Steviolbioside و Rebaudioside A,B,C,D,E,F و Rubsoside و Dulcoside و Steviosid (Mondaca وآخرون ، 2012 و Ghaheri وآخرون ، 2015) ويعد المركب Stevioside هو الالهام وذلك لاستخدامه في التحلية (Mizutani و Tanaka و Choi وآخرون 2002)، إذ يشكل هذا المركب ما بين 6-18 % من وزن اوراق النبات ويعتبر الاكثر حلاوة من بين جميع المركبات الاخرى (Brindle وآخرون، 2000). وقد ذكر Lutsenko (2016) ان Steviosid يمتاز بحلاوة عالية قد تصل الى 300-400 مرة من السكر، بالإضافة الى انه ارخص من السكر بثلاث مرات ، فضلا عن تميزه بنكهة بعد عملية التدنوق مع القليل من الطعم المر (Singh و Rao ، 2005) ويعد هذا المركب من المركبات البلورية التي تتميز بانها عديمة الرائحة وعادة يكون على شكل مسحوق ابيض اللون (Allam وآخرون، 2001)، الصيغة الكيميائية له $C_{30}H_{60}O_{18}$ (Abdul – Rahman وآخرون، 2015).

كيميائيا يتركب مركب Steviosid من ثلاث جزيئات من الكلوكوز وتمثل الجزيء الكلايكوني Glycine في المركب الكلايكوسيدي وجزيء واحد من Steviol وهو عبارة عن Diterpene carboxyl alcohol (Telmer و Brandle ، 2007) (شكل 2)



الشكل (2): مركب الستيفول ثنائي التربين

ذكر Richman وآخرون، (1999) بان مسلك البناء الحيوي للستيفول يمر بأربع خطوات مشتركة مع مسلك البناء الحيوي لحامض الجبرليك (شكل 3).



الشكل (3): مسلك MEP (Methylerythritol- 4-phosphate) للبناء الحيوي للمستيفيول في

اوراق نبات ستيفيا *Stevia rebaudiana* (Telmer و Brandle ، 2007)

يعد مركب Steviosid أعلى المركبات الكلايكوسيدية في أوراق ستيفيا إذ تبلغ نسبته ما بين 4-13% (وزن/وزن) (Cacciola وآخرون ، 2011) ، قدر Sivaram و Mukundan (2003) محتوى الكلوكوسيدات الحلوة Stevioside و Rebaudiosid A في نبات ورق السكر النسيجية والبذرية باستعمال جهاز HPTLC ولاحظا ان النباتات النسيجية تفوقت في محتواها من الكلوكوسيدات الحلوة واعطت 4.9% بينما اعطت النباتات البذرية 3.6% فقط .

درس Khan وآخرون (2011) طريقة استخلاص وتشخيص وتقدير محتوى Stevioside في عينات أوراق ستيفيا والمزروعة في البيوت البلاستيكية باستعمال جهازي HPTLC و HPLC ووجد ان التركيز كان يتراوح بين 0.1-1.0 ملغم.مل⁻¹

وقد اكد Samaha وآخرون، (2012) بدراسة توضح تشخيص وتقدير Stevioside و Rebaudiosid A في أوراق ستيفيا، إذ بينت النتائج تفوق Stevioside من بين كل كلوكوسيدات الستيفيول الشائعة من حيث الكمية وتلاه Rebaudiosid A. تم التحقق من وجود كلوكوسيدات التربينات الثنائية في مزارع الكالس ومزارع المعلقات (Bondarev وآخرون، 2001 و Mathur و Shekhawat، 2013).

وأكد Bondarev وآخرون (2001) إن مركبات Steviol-glycoside في النباتات المكثرة نسيجياً تكون أقل من النباتات النامية خارج المختبر، كما اشارت نتائج Rajasekaran وآخرون (2008) إن كمية Stevioside في الكالس هي اكثر من المعلقات الخلوية ، وتوصل Mathur و Shekhawat (2013) الى ان محتوى Stevioside كان مرتفعاً في المعلقات الخلوية خلال طور النمو الاسي للخلايا وانخفض في طور النمو الثابت .

Material and methods

3- المواد وطرائق العمل

Instrument

3-1 : الأجهزة المستعملة في هذه الدراسة

الأجهزة	الأجهزة	الشركة / المنشأ
انابيب حجم 1.5 مل ، 0.5 مل و 0.2 مل	Eppendorf Tubes	JET BIOFIL , Singapore
جهاز الطرد المركزي	Centerifuge	Fisher Scientific , USA
الماصة الدقيقة	Micropipette	Human , Germany
جهاز المزج	Vortex	Quality Lab System , England
حمام مائي	Water bath	China
جهاز تصوير الجل	Gel Imaging System	Major Science , Taiwan
جهاز الأوتوكلاف	Autoclave	China
كابينة سريان الهواء	Laminar air flow cabinet	USA
جهاز الترحيل الكهربائي	OWL Electrophoresis System	Thermo , USA
المطياف الضوئي	Quantus Florometer	Promega , USA
الثلاجة	Refrigerator	TEKA , Spain
جهاز التدوير الحراري	Thermal Cycler	BioRad , USA

3-2 : المواد المستعملة في هذه الدراسة

المواد	الشركة / المنشأ
ABIOpure™ Total DNA	ABIOpure , USA
Absolute Ethanol	ROMIL pure chemistry , UK
Agaros , Ethidium Bromide Solution (10mg/ml), Go Tag Green Master Mix, Nuclease Free Water, TAE 40X, Quantiflor dsDNA System.	Promega, USA
وسط MS الجاهز	Mumbai-400086, India

3-3 : طرائق العمل

أجريت التجارب المتعلقة بهذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية / قسم علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى . نفذت الإختبارات التجريبية كافة تحت ظروف التعقيم ، إذ عقمت جميع الأدوات من الملاقط والمشارط بعد تغليفها بورق الألمنيوم المقاوم للحرارة في جهاز المعقم الحراري البخار Autoclave وبدرجة حرارة 121 م⁰ وضغط 1.04 كيلوغرام/سم² ولمدة 30 دقيقة ، بالإضافة الى إستعمال الكحول الأيثلي بتركيز 95% مع الحرق وذلك لتعقيم الملاقط والمشارط عند إستعمالها في الزراعة داخل كابينة سريان الهواء المعقم Laminar air flow cabinet والمعقمه بأشعة UV لمدة 30 دقيقة وبعدها يتم المسح بالكحول الأيثلي بتركيز 70% (سلمان ، 1988) . حفظت العينات في غرفة النمو Growth room بدرجة حرارة 25± م⁰ وبنظام الضوء والظلام المتعاقب 16 ساعة ضوء و8 ساعة ظلام وشدة إضاءة 2000 لوكس .

3-3-1 : مصدر مزارع الكالس.

تم الحصول على مزارع الكالس المشتقة من مزارع المعلقات الخلوية من مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى. لتجربة طالب الماجستير (مصطفى عبد الكريم مصطفى)، استكمالاً لبحثه وحسب التوصيات التي أوصت بها رسالته. إذ تم ترقيم عينات الكالس المنقولة الى وسط الادامة والبالغ عددها (25 عينة) باعتبارها انسال مشتقة من مزارع المعلقات الخلوية لنبات الاستيفيا بطريقة النشر.

3-3-2 : تحضير الأوساط الغذائية

إستعمل وسط MS الجاهز (Mumbai-400086,India) (Murashige) و Skoog ، 1962) (جدول 1) والذي حضر بإذابة كل مكوناته إذابة تامة في الماء المقطر بحجم مناسب وأضيف إليه 30 غرام.لتر⁻¹ سكروز و 7 غرام. لتر⁻¹ Agar للتصليب ، ومن ثم إكمال

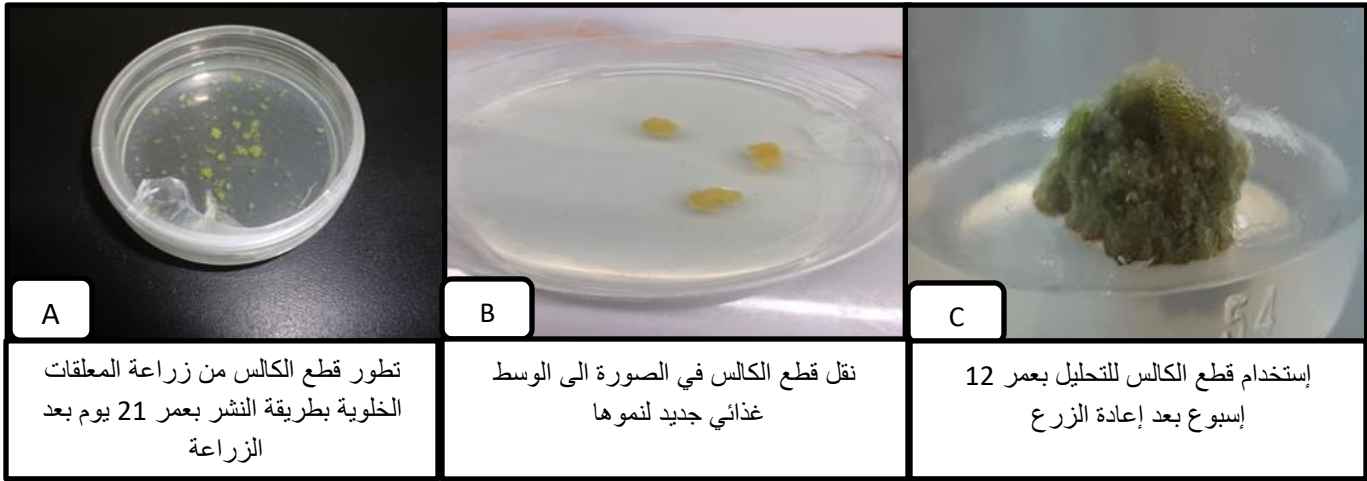
الحجم الى لتر واحد، وضبط الرقم الهيدروجيني pH ما بين 5.7 - 5.8 بوساطة محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو حامض الهيدروكلوريك HCl . تم استعمال هذا الوسط في حالته الصلبة في ادامة مزارع الكالس بعد تدعيمه بتركيز 2.0 ملغم.لتر⁻¹ NAA + 0.5 ملغم.لتر⁻¹ TZD¹ لغرض الحصول على اوزان كافية من الكالس والذي استخدم لاحقا في الاختبارات الجزيئية واختبارات تقدير محتواها من مركب Steviosid. عقت الأوساط الغذائية بجهاز المعقم بالبخار Autoclave بدرجة حرارة 121 م⁰ وضغط 1.04 كيلوغرام /سم² لمدة 20 دقيقة .

جدول (1) : مكونات الوسط الغذائي MS (Murashige و Skoog ، 1962)

ت	المادة	الصيغة	التركيز (ملغم.لتر ⁻¹)
أ-	العناصر الغذائية الكبرى		
-1	نترات الامونيوم	NH ₄ NO ₃	1650
-2	نترات البوتاسيوم	KNO ₃	1900
-3	كلوريد الكالسيوم المائي	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
-4	كبريتات المغنيسيوم المائية	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
-5	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH ₂ PO ₄	170
ب-	العناصر الغذائية الصغرى		
-1	حامض البوريك	H ₃ BO ₃	6.2
-2	كبريتات المنغنيز المائية	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
-3	كبريتات الزنك المائية	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
-4	مولبيدات الصوديوم المائية	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
-5	أيوديد البوتاسيوم	KI	0.83
-6	كبريتات النحاس المائية	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.025
-7	كلوريد الكوبلت المائي	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.025
-8	كبريتات الحديدوز المائية	FeSO ₄ .7 H ₂ O	27.8
-9	اثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك ثنائي املاح الصوديوم	Na ₂ EDTA	37.25
ج-	الفيتامينات والاحماض الامينية		
-1	ثايمين حامض الهيدروكلوريك	(Thiamine-HCl)	0.1
-2	حامض النيكوتينيك	(Nicotinic acid)	0.5
-3	بايروكسين حامض الهيدروكلوريك	(Pyridoxine-HCl)	0.5
-4	كلايسين	Glycine	2
-5	مايو اينوسيتول	Myo - Inositol	100
-1	سكروز	Sucrose	30.0 غم
-2	ماء مقطر	H ₂ O	1.0 لتر
-3	اكار	Agar	7.0 غم
-4	الرقم الهيدروجيني	pH	5.8-5.7

3-3-3 : إدامة أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .

أديم الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة النشر بعد وصولها حجم حبة الحمص حيث التقطت قطع الكالس وإعادة زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بتركيز 2.0 ملغم.لتر⁻¹ NAA + 0.5 ملغم.لتر⁻¹ TDZ (العزاوي ، 2020) (الشكل 4).



شكل (4) : مراحل نمو وتطور الخطوط الخلوية لقطع الكالس

4-3 : الدراسة الجزيئية

أجريت الإختبارات في مختبر التقدم العلمي ASCo. Learning center Guide في بغداد الحارثية . أعتمدت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD) للكشف عن الإختلافات الوراثية بين النبات الام والكالس الناتج من الام والكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية لنبات الإستيفيا .

1-4-3 : استخلاص الدنا DNA Extraction

- 1- أُخذت العينات لكل من أوراق نبات السكرالإستيفيا والكالس المستحث من الأوراق والكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية لنبات الإستيفيا الى المختبر لغرض إستخلاص الحامض النووي منها حسب بروتوكول إستخلاص ABIO pure.
- 2- اخذ 20 ميكروليتر من محلول أنزيم بروتينيز Proteinase K 20 ملغم/مل⁻¹ و 200 مايكروليتر من محلول دارئ BL Buffer لغرض هضم البروتين وإنحلال الخلايا واضيفت الى 100 ملغم من العينة الموجودة في انبوبة إندروف وبعدها مزجت باستخدام جهاز المزج Vortex وحضنت العينات عند 56 م⁰ لمدة 24 ساعة .
- 3- اضيف 200 ميكروليتر من كحول الايثانول المطلق الى العينات ثم مزجت بجهاز Vortex بنسبة مئة بالمئة .
- 4- نقلت جميع المخاليط الى انبوب الجمع الصغير بحذر ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند سرعة دوران تبلغ 6000 xg (أكثر من 8000 دورة بالدقيقة) وتم إستبدال أنبوب الجمع بانبوب جمع جديد .
- 5- اضيف 600 مايكروليتر من المحلول الدارئ BW Buffer الى انبوب الجمع الصغير ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند 6000 xg (أكثر من 8000 دورة بالدقيقة) ثم إستبدل انبوب الجمع بانبوب جديد .
- 6- استخدم 700 مايكروليتر من محلول TW Buffer ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند 6000 xg (أكثر من 8000 دورة بالدقيقة)، ثم سكب الجزء العلوي (الراشح) واعيد تثبيت الأنبوب الصغير بانبوب الجمع .
- 7- وضع الانبوب الصغير في جهاز الطرد المركزي على السرعة الكاملة (أكثر من 13000xg) لمدة دقيقة واحدة لإزالة ما تبقى من محلول الغسل Elution Buffre من العينة ثم وضع الانبوب الصغير جدا في انبوب أبندروف جديد حجم 1.5 مل .

8- اضيف 100 مايكروليتر من محلول الدارئ AE Buffre الى العينات وتم حضنها لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة الغرفة ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة تبلغ 5000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق .

3-4-2 : قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الدنا .

قيس تركيز الدنا للعينات قيد الدراسة باستعمال جهاز المطياف الضوئي ذو القطرة النانوية Nano drop-spectrophotometer المجهز من قبل شركة Bio Drop وبطول موجي 260 نانوميتر أما النقاوة فتعتمد على النسبة بين قرائتي الجهاز على الطولين الموجيين 260 و 280 نانوميتر ، إذ صفر الجهاز بوضع 2 مايكروليتر من محلول TE ، بعدها وضعت 2 مايكروليتر من الدنا العينات في بؤرة الجهاز وجرى قياس تركيز ونقاوة الدنا وقد تراوح تركيز العينات بين 10-59 مايكروغرام/ مايكروليتر ، ونقاوة 1.91.

3-4-3 : تحضير البادئات العشوائية لتقانة RAPD

اعتمدت في هذه الدراسة 15 بادئ عشوائي لتقانة RAPD تم الحصول عليها من شركة (Korea Bioneer) لمعرفة أي منها تعكس تعدداً شكلياً Polymorphism في دنا العينات المدروسة . إذ تم إذابة وتخفيف البادئات بالماء المقطر الايوني وحسب كل تركيز مثبت على البوادي . أخذ 10 مايكروليتر من محلول البادئ وخفف بإضافة 90 مايكروليتر من الماء المقطر الأيوني ليكون التركيز النهائي 100 مايكروليتر .

3-4-4 : تضاعف دنا العينات النباتية مع البادئات العشوائية باستعمال جهاز PCR

اجريت كافة تفاعلات التضخيم العشوائي وفقاً الى Williams وآخرون (1993) ، ولإجراء التفاعل لابد من توافر المحاليل والمواد الاتية :

1- خليط التفاعل الرئيس Master Mix

استعمل خليط التفاعل الرئيس جدول (2) نوع G2-Green master mix والمجهز من شركة (Promega, USA) .

الجدول (2): مكونات G2 – Green master mix

المكون	الكمية لحجم 25 مايكروليتر تفاعل
Taq DNA polymerase dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) pyrophosphatase and pyrophosphate PCR Buffer with 2mM MgCl ₂ Stabilizer and tracking dye	1 وحدة 250 مايكرومولار

2- البادئات العشوائية Primers

أستعمل 15 بادئ (جدول 3) المبين أسمائها وتتابع ونوع القواعد النتروجينية المكونة لها المستعملة في تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD).

الجدول (3) : البادئات العشوائية المستعملة في تقانة RAPD

ت	إسم البادئ	التسلسل 5'-3"
1	OPA-10	GTGATCGCAG
2	OPC-09	CTCACCGTCC
3	OPC-15	GACGGATCAG
4	OPC-16	CACACTCCAG
5	OPW-07	CTGGACGTCA
6	OPW-09	GTGACCGAGT
7	OPW-19	CAAAGCGCTC
8	OPX-02	TTCCGCCACC
9	OPX-03	TGGCGCAGTG
10	P-168904	CAGTICTGGC
11	P-168906	CCACCGCCAG
12	P-168910	CAGTICGAGG
13	SIGMA-5383-043	AAACAGCCCG
14	SIGMA-5383-064	TGGAAGAGGC
15	SIGMA-5383-091	TCGGAGTGCC

3- الترحيل الكهربائي لنواتج البودئ وتصويره وتحليل الحزم لكل عينة نباتية وتشمل طريقة العمل الخطوات الآتية :

أولاً : مزجت مكونات الخليط المبينة في الجدول (4)

الجدول (4) : مكونات خليط تفاعل PCR – RAPD

الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)	المكونات
10	خليط التفاعل الرئيس G2- Green master mix
1.5	البادئ
4	عينة دنا
4.5	ماء مقطر ايوني
20	حجم التفاعل النهائي

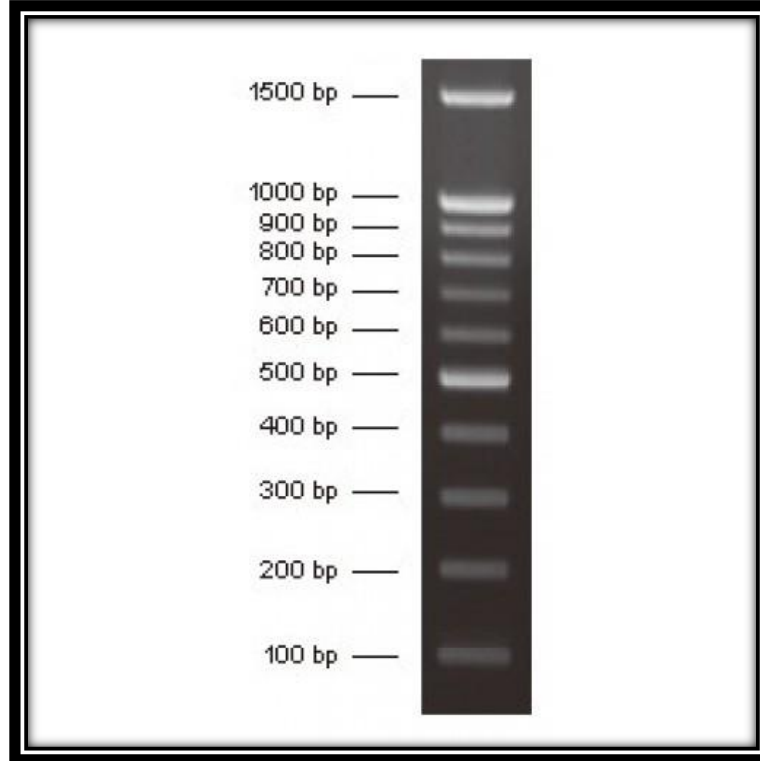
ثانياً : تم نبذ الخليط باستخدام جهاز الطرد المركزي لثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوبة. نقلت العينات الى جهاز التدوير الحراري Thermo cycler لبدء التفاعل التضاعفي وحسب خطوات برنامج البلمرة الموضحة في الجدول (5).

الجدول (5) : مراحل التفاعل التضاعفي في جهاز البلمرة المتسلسل

ت	المرحلة	درجة الحرارة (م)	المدة الزمنية (دقيقة)	عدد الدورات
1	Pre-Denaturation	94	5	1
2	Denaturation	94	1	40
3	Annealing	36	1	40
4	Extension	72	1	40
5	Final extension	72	5	1

5-4-3 : الدليل الحجمي DNA Ladder

قُدرت الأوزان الجزيئية ونوعية الدنا المعزول واختبار البادئات العشوائية المستعملة بترجيلها الكهربائي على هلام الاكاروز للعينات بالتوازي مع مؤشر وزن جزيئي يتكون من قطع الحامض النووي الدنا المعروف وزنه الجزيئي والمقطع بانزيمات قطع مختلفة والذي جهز من من قبل شركة Korea Bioneer، إذ استعمل مؤشر وزن جزيئي 100 bp DNA Ladder ذو أوزان جزيئية معروفة (100 - 1500 زوج قاعدي) والمكون من 11 حزمة وكما مبين (الشكل 5) اضيف الى الحفرة المخصصة له على احد جوانب الهلام وعند بدء عملية الترحيل تظهر قطع معروفة الوزن الجزيئي، يرسم منحنى العلاقة بين الوزن الجزيئي للدليل الحجمي (المحور السيني) والمسافة المقطوعة بالترحيل الكهربائي (المحور الصادي) لتقدير الأوزان الجزيئية لنواتج تفاعل البلمرة .



شكل (5) : الدليل الحجمي DNA Ladder 1500bp

3-4-6 : ترحيل العينات كهربائياً Electrophoresis

بعد تضخيم قطع الدنا بإستعمال جهاز الـ PCR ، تم إعتداد الهجرة الكهربائية بواسطة هلام الأكاروز لتأكيد وجود التضخيم . كان الـ PCR معتمداً كلياً على معيار الدنا المستخلص .

3-4-7 : المحاليل : Solutions

محلول دارئ 1XTAE ، بروميد الإيثيديوم (10ملغم.مل⁻¹)

3-4-8 : تحضير الأكاروز Preparation of agarose

- 1- تم أخذ 100 مل من TAE buffer في Beaker .
- 2- اضيف 1 غم (1%) أكاروز الى Beaker .
- 3- تم تسخين المحلول الى درجة الغليان باستخدام جهاز المايكرويف حتى تمت إذابة جميع جسيمات الهلام .
- 4- اضيف 1 مايكروليتر من بروميد الايثيديوم (10 ملغم.مل⁻¹) الى الأكاروز .
- 5- تم تحريك الأكاروز لكي يتم خلطه مع تجنب حدوث الفقاعات .
- 6- ترك المحلول ليبرد حتى درجة حرارة 50 -60 م⁰.

3-4-9 : صب هلام الأكاروز الأفقي Casting of the horizontal agarose

تم صب محلول الأكاروز في حوض الهلام بعد أن تم غلق كلتا الحافتين بإحكام باستخدام أشرطة سليوفان وترك الأكاروز حتى يتصلب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ، وقد تمت إزالة المشط بعناية ووضع الهلام في حوض الترحيل الحاوي على المحلول المنظم القياسي -1X TAE electrophoresis buffer حتى يصل الى ارتفاع 3-5 ملم فوق سطح الهلام .

10-4-3 : تحميل الدنا DNA Loading

مزج 5.0 مايكروليتر من مؤشرات الحجم الجزيئي (شكل 4) المكونة 11 حزمة أوزانها (100-1500 زوج قاعدي) مع 5.0 مايكروليتر من صبغة التحميل ووضعت في الحفرة الأولى وكذلك مزج نتائج PCR ووضعت في الحفر الأخرى (1-25) بعد أن مزجت مع الصبغة وعرضت لتيار كهربائي بمقدار 100 فولت (1 فولت .سم²) لمدة 75 دقيقة ، إذ يتحرك الدنا من القطب السالب الى القطب الموجب ، وتم رؤية الحزم المصبوغة ببروميد الإيثيديوم في الهلام بالعين المجردة باستخدام بإستخدام جهاز تصوير الهلام Gel imaging system .

11-4-3 : تحليل نتائج RAPD

حللت نتائج RAPD التي ظهرت في الهلام بعد تحويل النتائج التوصيفية الى بيانات رقمية بوضع رقم 1 عند وجود الحزمة و0 في غيابها على أساس الحجم ، ثم تم تحليل مصفوفة الـ RAPD باستخدام الإصدار 2.1 من الحزمة الإحصائية (Numerical Taxonomy System) NTSYS-pc . أُستخدمت مصفوفة البيانات لحساب التشابه الجيني داخل الأنواع وفيما بينها استناداً الى معاملات تشابه Jaccard، وتم إنشاء مخطط شجري لإستعراض العلاقات بين 25 نسلاً باستخدام طريقة مجموعة الزوج غير الموزونة مع المتوسط الحسابي (UPGMA). كما تم حساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئ من خلال المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية (\%)} = \frac{\text{التعددية الشكلية لكل بادئ}}{\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ}} \times 100$$

تم حساب النسبة المئوية للقدرة التمييزية لكل بادئ حسب المعادلة الآتية:

$$\text{القدرة التمييزية لكل بادئ (\%)} = \frac{\text{عدد الحزم المتباينة للبادئ}}{\text{عدد الحزم المتباينة لكل البادئات}} \times 100$$

أما النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ فتم حسابها حسب المعادلة الآتية :

كفاءة كل بادئ (%) = (العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات) $\times 100$.

(Grundmann) وآخرون ، 1995.

3-5 : تقدير محتوى الستيفوسايد Steviosid في أوراق نبات

ستيفيا وكالس الورقة ومعلقاتها الخلوية ، باستخدام تقانة

كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء High-Performance

LiquidChromatography (HPLC)

أجري هذا العمل في وزارة العلوم والتكنولوجيا / مركز بحوث المواد والعدد الطبية والصيدلانية لإجراء التحليلات المخبرية . أستخدم جهاز HPLC ياباني المنشأ من نوع Liquid Chromatography Shimadzu (LC-2010 AHT-Auto) في الكشف عن الكلايكوسيدات في المستخلص النباتي لعينات نبات *Stevia rebaudiana* .

3-5-1 : تحضير العينات وشملت كلاً مما يأتي .

أ- أوراق النبات الأم المزروعة في أصيص داخل البيت النباتي في المختبر

ب-الكالس المستحث من اوراق النباتات النامي على وسط 2.0 ملغم.لتر⁻¹

NAA 0.5+ ملغم.لتر⁻¹ TDZ ومدعم بتركيز من السكر 30 غم.لتر⁻¹

¹ بعمر 30 يوم.

ت-الكالس المشتق من زراعة المعلقات بطريقة النشر والمدمام على وسط 2.0

ملغم.لتر⁻¹ NAA 0.5+ ملغم.لتر⁻¹ TDZ .

3-5-2: إستخلاص وفصل الستيفوسايد باستخدام تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الاداء HPLC .

تم الإستخلاص حسب طريقة Lenis وآخرون (2013)، أُستخلص 1 غم من مسحوق الورقة والكالس بالماء منزوع الأيونات بنسبة 1-6 مادة صلبة (في 35 م⁰) ثم عرض المستخلص الى موجات فوق الصوتية عند 60 % من دورات العمل لمدة 25 دقيقة تم طرد المستخلص بعدها بجهاز الطرد المركزي عند 7500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة . عرض الراشح للمعالجة بالفحم لإزالة الصبغات قبل التبخر تحت التفريغ . تم إعادة تعليق العينات المجففة في 1.0 مل من الايثانول نوع HPLC ووضعها في جهاز المزج ، ثم مرر الخليط من خلال مرشح Sep-pak cartridge filter 2.5 ميكروميتر وتخزينه عند 4 م⁰ لحين الإستعمال ، حقن 20 مايكروليتر من كل عينات ممثلة للمجاميع الوراثية (وفقاً للدراسة الجزيئية التي تم دراستها في هذا البحث) في جهاز HPLC وفقاً للحالة المثلى .

3-5-3 : التشخيص والتقدير الكمي للستيفوسايد Stevioside بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الاداء HPLC .

أجريت عملية الفصل والتشخيص لمركبات ستيفوسايد المستخلصة من العينات المنتخبة في الفقرة (3-3-1) باستعمال جهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء (HPLC) من خلال حساب مساحة المنحنيات وتحديد تركيز هذه المركبات بعملية واحدة . إذ قدرت تراكيز مركبات الستيفوسايد كميّاً بمقارنة مساحة المادة القياسية (الشكل 4) مع مساحة حزمة النموذج اعتماداً على القانون الاتي :

$$\text{تركيز النموذج مايكروغرام/مل} = \frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة النموذج القياسية}} \times \text{تركيز النموذج القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

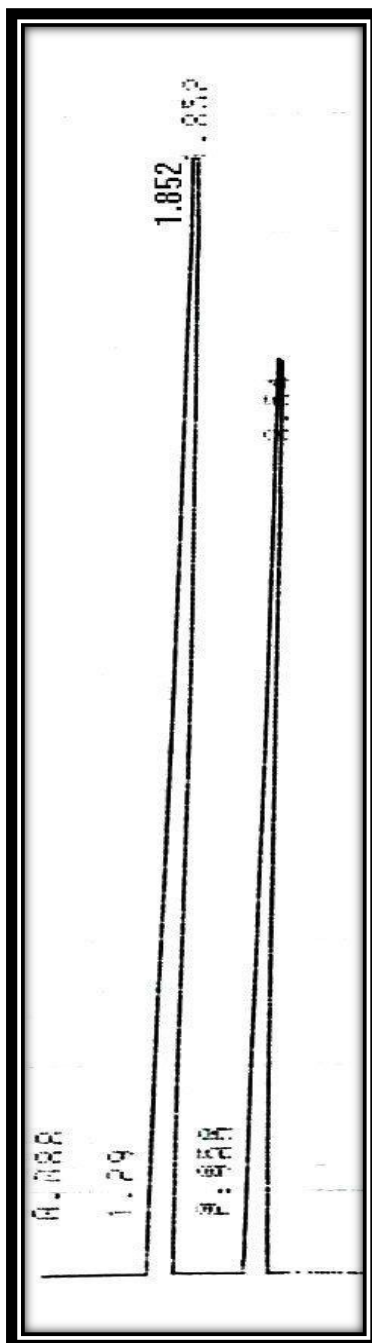
أجريت عملية التشخيص وفق ظروف التشخيص المبينة في الجدول (2)

استعمل جهاز HPLC نوع (SHIMADZU10AV-LC) المزود بمضختين
ترددية نوع shimadzu LC-10A بمقياس الطيف الضوئي UV-Vis 10 A-
SPD عند طول موجي 245 nm ، تم قياس المركبات المفصولة والخارجة
من العمود ورسم الكروماتوكراف باستخدام معالج بيانات نوع CR-6A بعمود
فصل معدني ذي المواصفات التالية :

- الطور الثابت نوع C-18
- ابعاده 3D mm 50×20
- حجم الدقائق 3 مايكرومتر

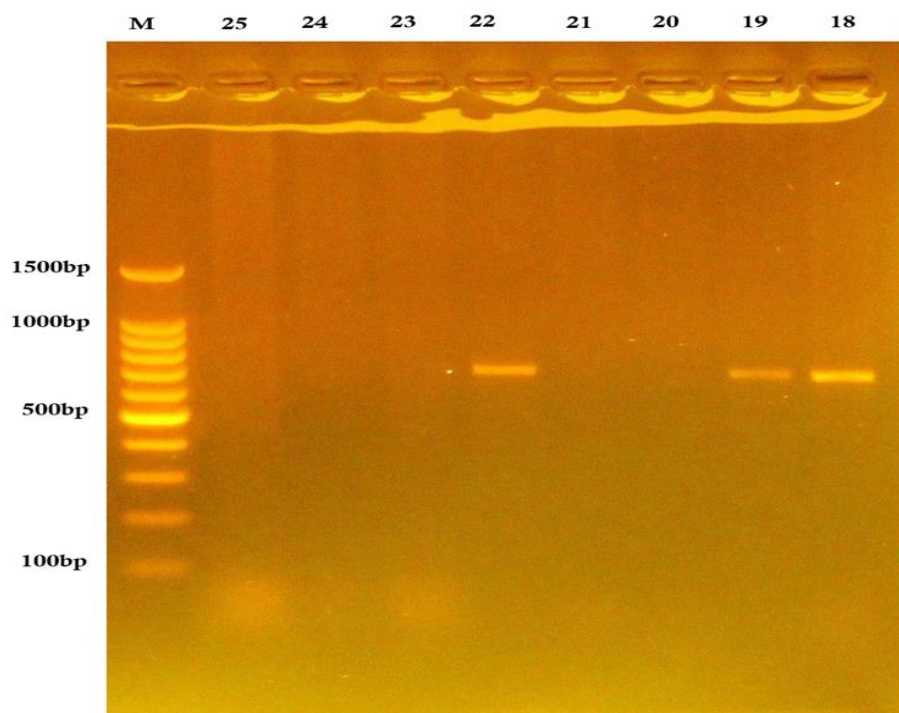
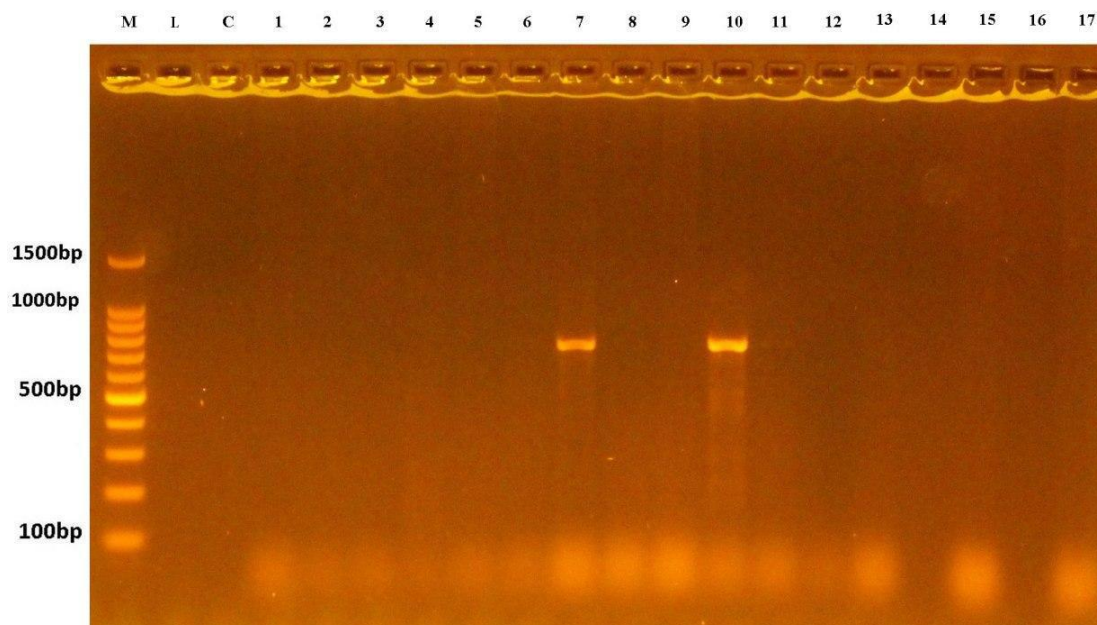
الجدول (6) : ظروف تشخيص النماذج القياسية من Stevioside والمركبات المفصولة من العينات
المنتخبة .

الظروف	
الطور المتحرك (v:v)	Dionized water : acetonitrile (80:20,v/v)PH3.2 HCL 0.1%
سرعة جريان الطور المتحرك	1.2 مل/دقيقة
حجم العينة المحقونة	20 مايكروليتر
درجة حرارة الفصل	35 م°
نوع الكاشف	الاشعة فوق البنفسجية (UV) عند طول موجي 245 nm



الشكل (6) : المنحنى القياسي لمركب Steviosid للعينة القياسية

[illegible]



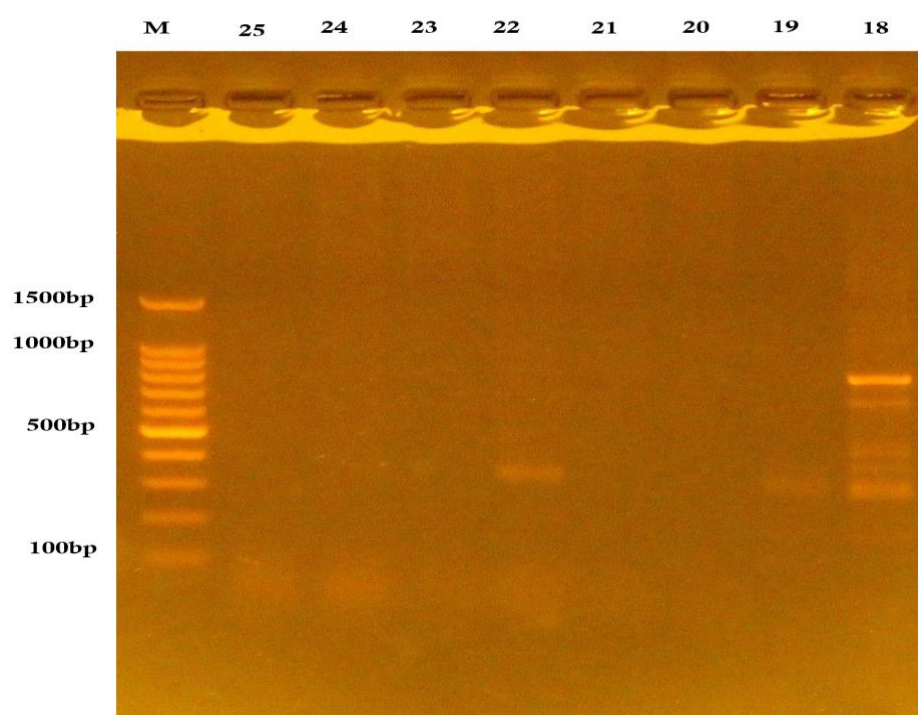
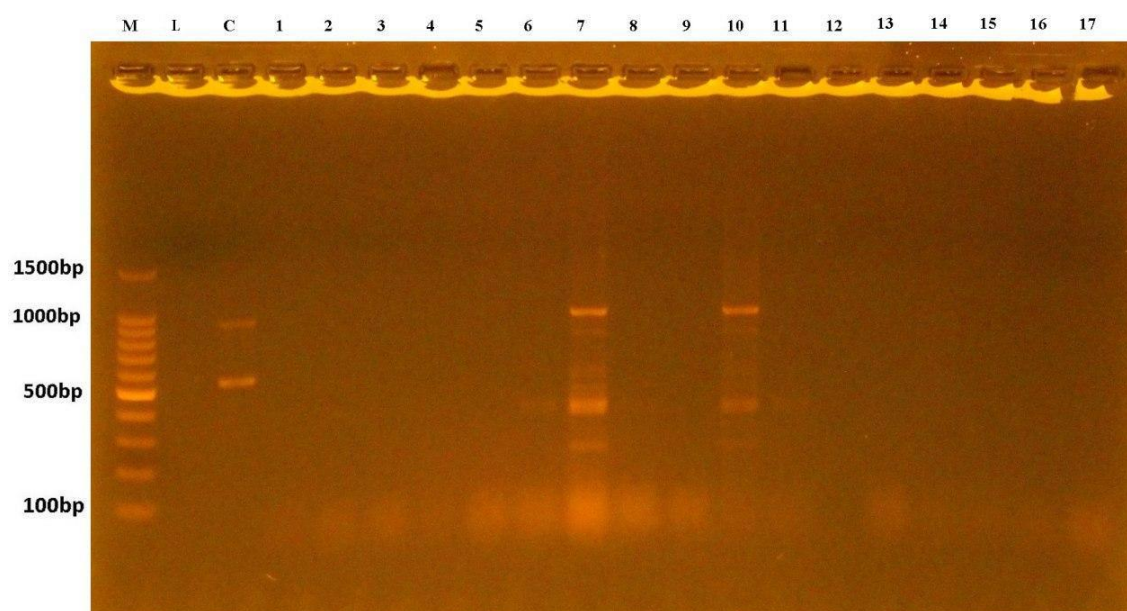
الصورة (1) : نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ P-168904 للعينات كافة ، إذ يمثل (M) الدليل الحجمي (L) عينة الورقة ، (C) كالس الورقة ، (1-25) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .

P-168906 2-البادئ

أنتج البادئ 14 حزمة بلغت احجامها الجزيئية ما بين 1100-280 ، بواقع 1100 زوج قاعدي في النسولين (7 و 10)، وحزمة واحدة 900 و 800 في كل من النسولين (7 و 18) على التوالي ، وبواقع حزمتين 650 زوج قاعدي في النسولين (8 و 18)، وأظهر هذا البادئ ثلاث حزم 400 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10 و 18)، وحزمة واحدة 350 زوج قاعدي في النسل (22) والتي لم تظهر في بقية أنسال هذا البادئ ، وثلاث حزم 300 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10 و 20) ، وبواقع حزمة واحدة 280 زوج قاعدي في النسل (18) . وكانت كفاءة البادئ والقدرة التمييزية له لبلغت 19.51 (جدول 8) (صورة 2) .

الجدول (8): الحزم الناتجة من تضاعف البادئ P-168906 لعينات النبات المدروسة مع احجامها الحزنية .

[illegible]

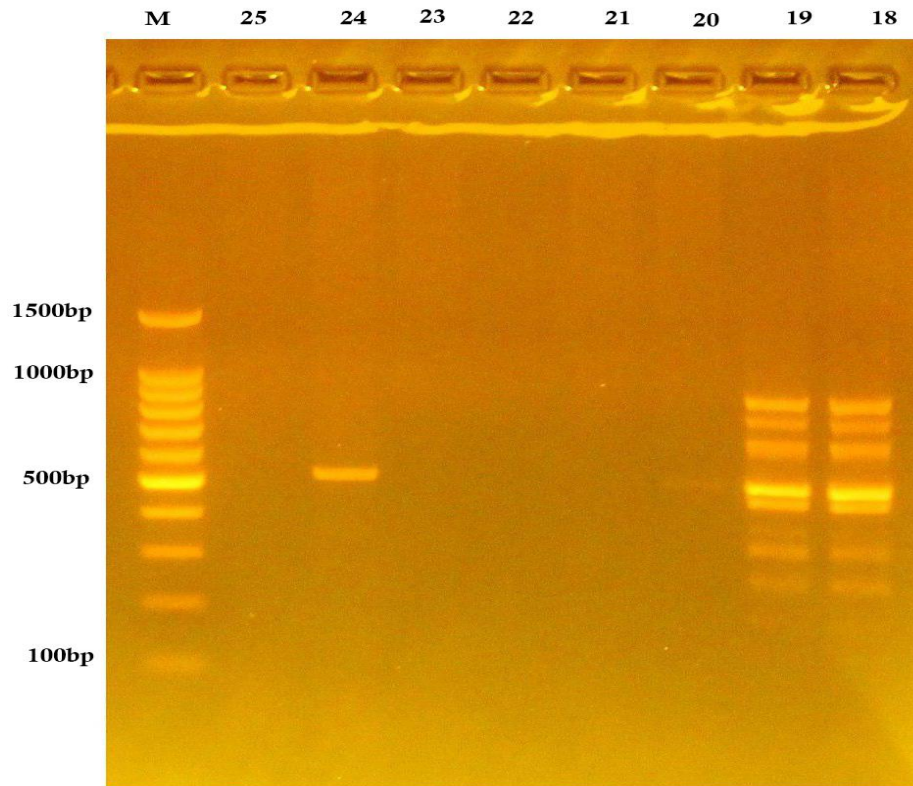
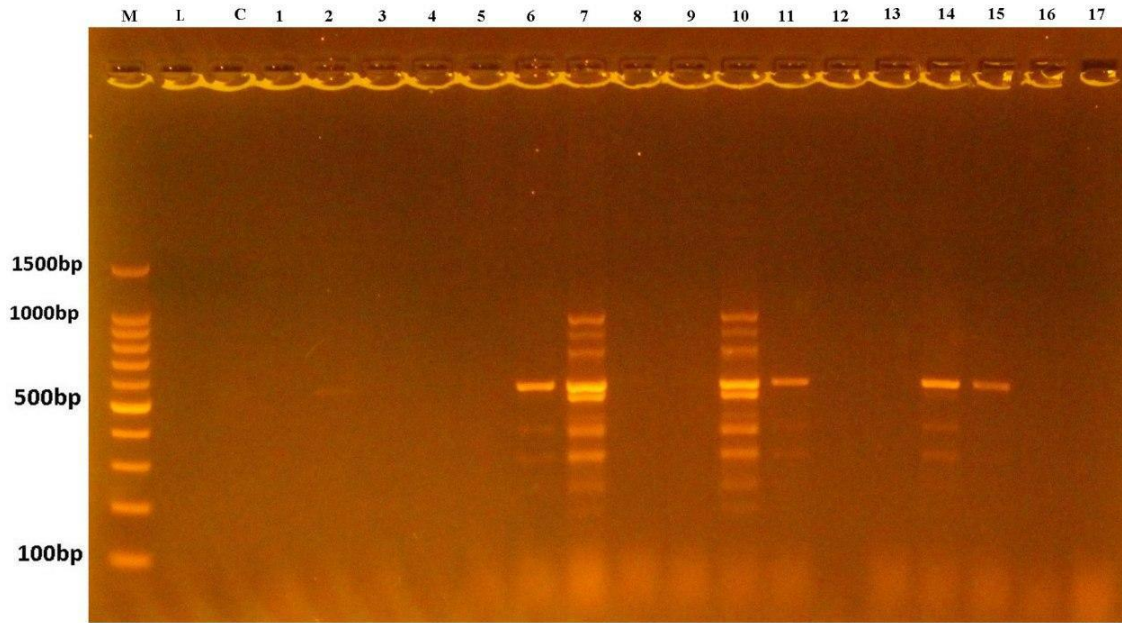


الصورة (2) : نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ P-168906 للعينات كافة ، إذ يمثل (M) الدليل الحجمي، (L) عينة الورقة (C) كالس الورقة ، (1-25) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية .

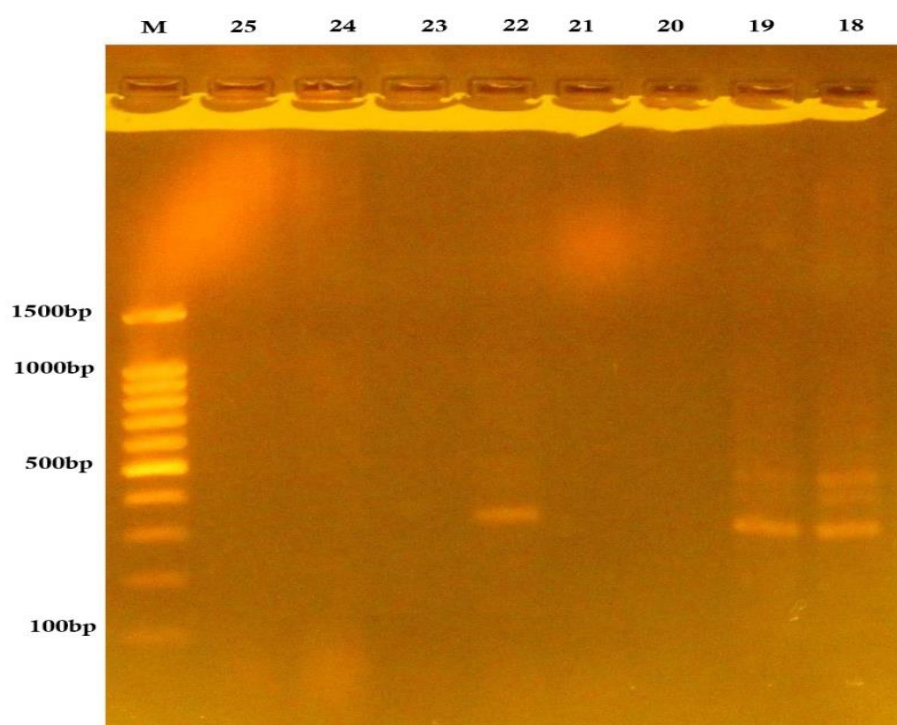
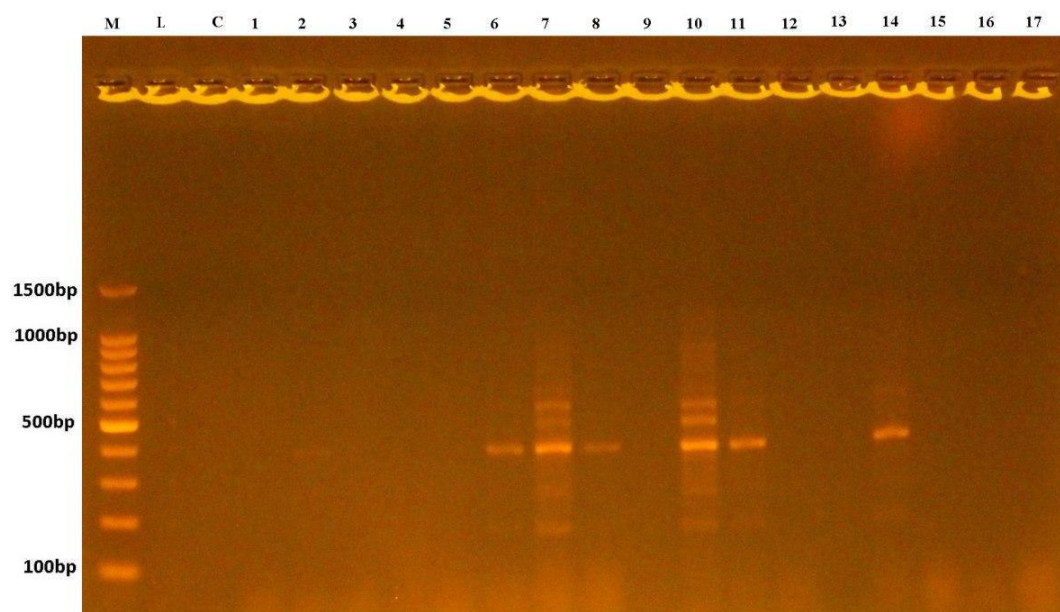
3- البادئ SIGMA-5383-043

بلغ عدد الحزم الناتجة من هذا البادئ 38 حزمة تراوحت احجامها الجزيئية ما بين 250-1100 زوج قاعدي، حزمتين بحجم جزيئي 1100-1000 زوج قاعدي على التوالي في الأنسال (10 و 7)، و 8 حزم 900 و 800 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10، 18، و 19) على التوالي ، و 4 حزم 680 و 650 زوج قاعدي في النسلين (18 و 19) بالتتابع ، وأظهر هذا البادئ ايضاً 6 حزم ذات حجم جزيئي 600 زوج قاعدي في الأنسال (6، 7، 10، 11، 13، و 14) ، و 3 حزم 550 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10، و 24)، و 4 حزم 500 و 460 زوج قاعدي على التوالي في النسلين (18 و 19) ، وظهرت أيضاً 3 حزم 400 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10، و 14)، وحزمتين 350 زوج قاعدي في النسلين (7 و 10)، وبواقع حزمتان 300 زوج قاعدي في النسلين (18 و 19)، و 4 حزم 250 زوج قاعدي في الأنسال (7، 10، 18، و 19) . وكانت كفاءة البادئ والقدرة التمييزية له لبلغت 34.146 (الجدول 9) (الصورة 3) .

[illegible]

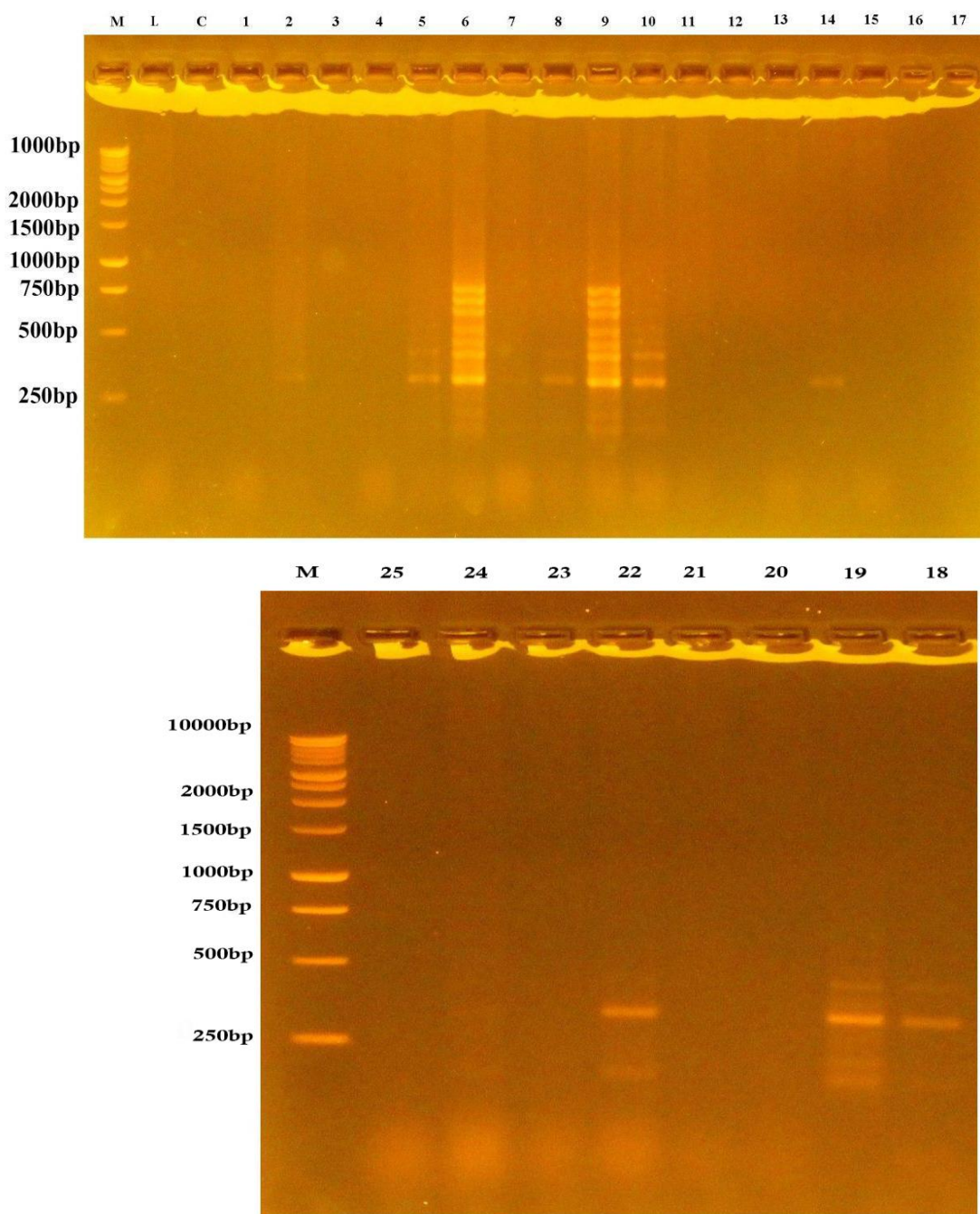


الصورة (3) : نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-043 للعينات كافة ، إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (c) كالس الورقة ، (1-25) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية.



الصورة (4) : نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-
 064 للعينات كافة ، اذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (C)
 كالس الورقة ، (1-25) انسال الكالس المشتق من المعلقات الخلوية

25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	C	L	الوزن الجزيئي bp
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	350
0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	375
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	450
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	525
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	550
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	600
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	750

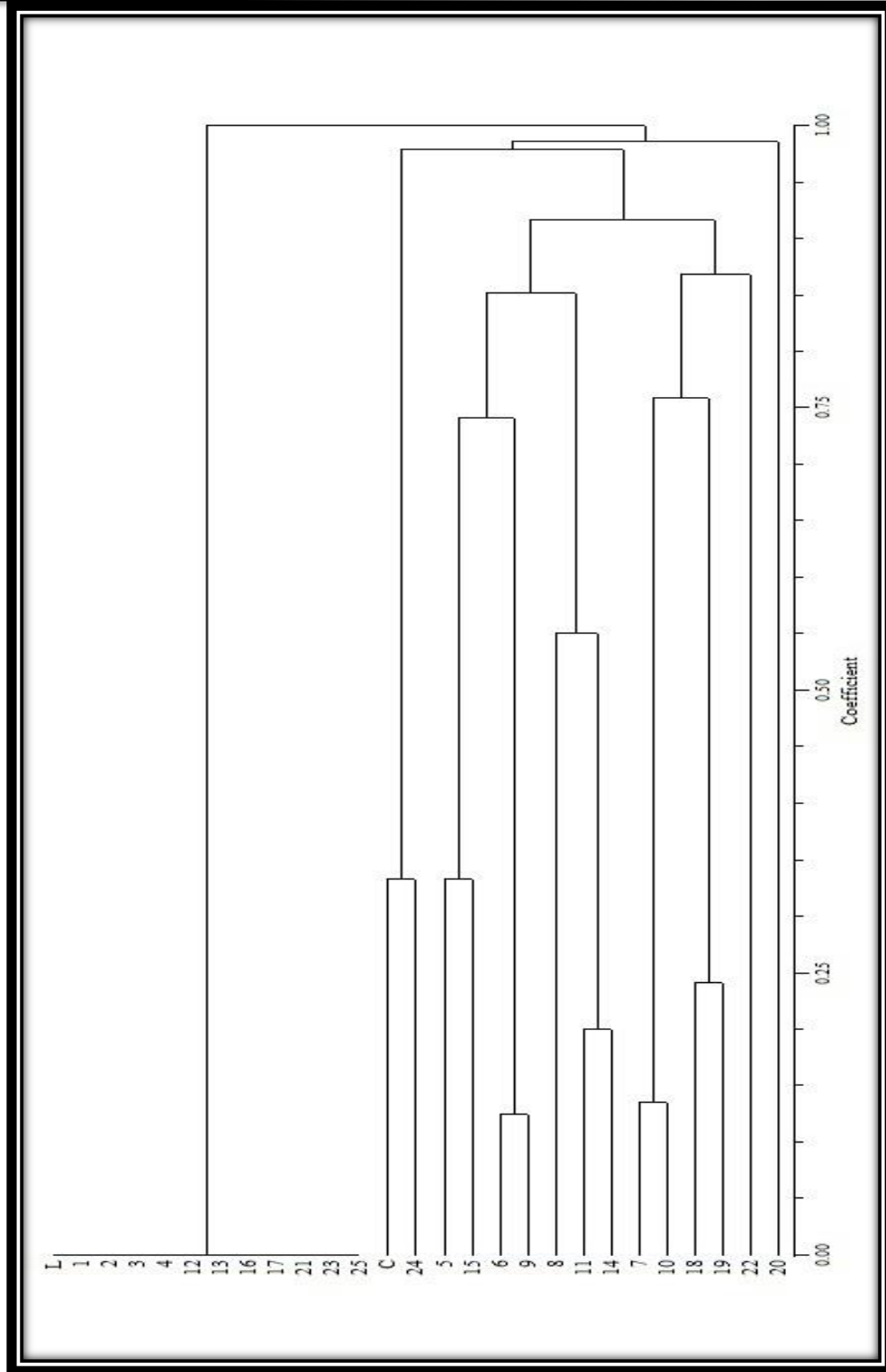


الصورة (5) : نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ SIGMA-5383-091 للعينات كافة ، إذ يمثل (M) الدليل الحجمي ، (L) عينة الورقة ، (C) كالس الورقة ، (1-25) أنسال الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية

2-4 : العلاقات الجينية بين الاشكال الجينية لنبات الستيفيا بواسطة

تقنية RAPD

اظهر المخطط الناتج عن 27 نمطا وراثيا في الشكل (7) ، وكنظرة اولى له نجد بشكل عام ان بأماكننا التمييز بوجود تباعد وراثي متباين بين الانسال المدروسة حيث انقسمت الى اربع مجاميع رئيسية حسب تباعدها الوراثي ضمت المجموعة الأولى الأنماط (L و 1 و 2 و 3 و 4 و 12 و 13 و 16 و 17 و 21 و 23 و 25) وهي متشابهة وراثيا فيما بينها في حين ضمت المجموعة الثانية النمط الوراثي رقم (20) والذي كان متباعدا وراثيا عن جميع الأنماط المدروسة ومنها النمط (L و C) وتكونت المجموعة الرئيسية الثالثة من النمطان الوراثيان (C و 24) والذان كان بينهما تشابه عالي في حين دخلت بقية الأنماط في المجموعة الرئيسية الرابعة إذ تجزئة الى مجموعتين ثانويتين احتوت الأولى على الأنماط (22 و 19 و 18 و 10 و 7) بينما ضمت المجموعة الثانوية الثانية الأنماط (5 و 15 و 6 و 9 و 8 و 11 و 14).



الشكل (7): مخطط شجرة القرابة الوراثية الذي يوضح العلاقات الجينية بين الاشكال الجينية لنبات

الستيفيا *Stevia repauidiana* B.

الجدول (12) : مصفوفة قيم البعد الوراثي بين الأنماط المدروسة

	بقية L+ العينات	C	5	6	7	8	9	10	11	14	15	18	19	2 0	2 2	2 4
بقية L+ العينات	0															
C	1	0														
5	1	1	0													
6	1	1	0.8	0												
7	1	0.8	1	0.851	0											
8	1	1	1	0.818	0.9	0										
9	1	1	0.75	0.125	1	1	0									
10	1	0.9047	0.9	0.714	0.1351	0.9047	0.8461	0								
11	1	1	1	0.6363	0.8	0.5	1	0.80952	0							
14	1	1	1	0.6666	0.71429	0.6	1	0.72727	0.2	0						
15	1	1	0.3333	0.6363	0.9	1	0.77778	0.80952	0.5	0.6	0					
18	1	1	1	0.9230	0.77143	0.8947	0.91667	0.72222	1	1	1	0				
19	1	1	1	0.9047	0.8	1	0.89474	0.74194	1	1	1	0.241	0			
20	1	1	1		0.89474	1	1	0.9	1	1	1	1	1	0		
22	1	1	1	0.846	1	1	0.8181	0.9130	1	1	1	0.809	0.75	1	0	
24	1	0.3333	1	1	0.8947	1	1	0.9	1	1	1	1	1	1	1	0

الجدول (13): العدد الإجمالي ونطاق الحجم للمناطق المضخمة التي تم الحصول عليها لكل بادئ من طريقة RAPD .

إسم البادئ	حجم معدل الإرتباط bp	الحزم الكلية	حزم متعددة الأشكال	النسبة المنوية	عدد الحزم ذات شكل واحد	نسبة منوية	كفاءة البادئ %	القدرة التمييزية %
P-168604	700-800	2	2	100	0	0	4.87	4.87
P-168606	1100-280	8	8	100	0	0	19.51	19.51
SIGMA-5383-043	1100-250	14	14	100	0	0	34.146	34.146
SIGMA-5383-064	600-150	9	9	100	0	0	21.95	21.95
SIGMA-5383-091	750-200	8	8	100	0	0	19.51	19.51
		41	41					

تباينت نتائج تفاعلات RAPD تبعاً للبادئ المستعمل ، فقد كان العدد الكلي للحزم الناتجة 41 حزمة مضاعفة عبر النماذج 27 المختلفة من دنا الأنسال والتي تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين 1100-150 زوج قاعدي ، أما الحزم المتباينة والتي تعد أساسية في تقدير البعد الوراثي بين أنسال نبات ستيفيا فقد بلغ عددها 41 حزمة (جدول 12)، إذ أعطى البادئ sigma-5383-043 أعلى عدد من الحزم المتباينة والتي بلغت 14 حزمة ، بينما أعطى البادئ P-168904 أقل عدد من الحزم المتباينة والتي بلغت حزمتين فقط.

تم الحصول على نمط ذو درجة تباعد متباينة من 27 نباتاً تم اختياره عشوائياً مع الام استناداً الى علامات RAPD وتميز النمط 20 بأنه الأبعد وراثية عن بقية الأنماط المدروسة في حين كانت هناك أنماط متشابهة بدرجة عالية مع الأم. واتفقت قسم من هذه النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج Singh وآخرون (2017) الذي أكد على ان جميع نباتات ستيفيا التي تم تجديدها من

خلال زراعة الأنسجة كانت موازية تماماً للنبات الأم وبدرجة تقارب كبيرة .كما لوحظت نتائج مماثلة لـ (Sivaram و Mukundan ، 2003) .

فضلاً عن ان علامات RAPD المستخدمة تضمن اختبار الدقة والنتائج وتشير الى ان جميع النباتات التي تم الحصول عليها من الكالس تعود الى نفس النوع ولا توجد اختلافات في الشكل بين تلك النباتات ، في حين تتفق بقية النتائج مع ما وجدته Singh وآخرون (2014) التي اظهرت تجربته مستوى عال من التباين الجيني . وقد أكد Dalmasso وآخرون (2004) ان الحزم المتضاعفة التي تظهر على هلام الاكاروز ذات الحجام الجزيئية المختلفة تعتمد على نوع البادئ المستعمل ، إذ إنها تؤثر على حجم الحزم المتضاعفة.

3-4 : التشخيص والتقدير الكمي لمحتوى Steviosid بأستخدام

تقنية HPLC

بينت المنحنيات المسجلة والناجمة من حقن العينات المتباينة اعتماداً على الاختبار الجزيئي لنبات ستيفيا في جهاز كروماتوغرافيا السائل العالي الاداء (HPLC) احتوائها مركب Steviosid بدلالة زمن الاحتباس المسجل مع زمن احتباس العينة القياسية لمركب Steviosid على النحو التالي :

1-3-4 : اوراق نبات ستيفيا

أظهرت النتائج (الجدول 14) إحتواء مستخلص عينات الاوراق من مركب Steviosid بالاعتماد على قيم زمن الاحتباس وبالمقاربة من زمن احتباس العينة القياسية لمركب Steviosid، وان تركيز المركب قد بلغ 1.084 مايكروغرام.مل⁻¹ اعتماداً على نسب مساحة المنحنيات المسجلة لعينات الاوراق (شكل 8) .

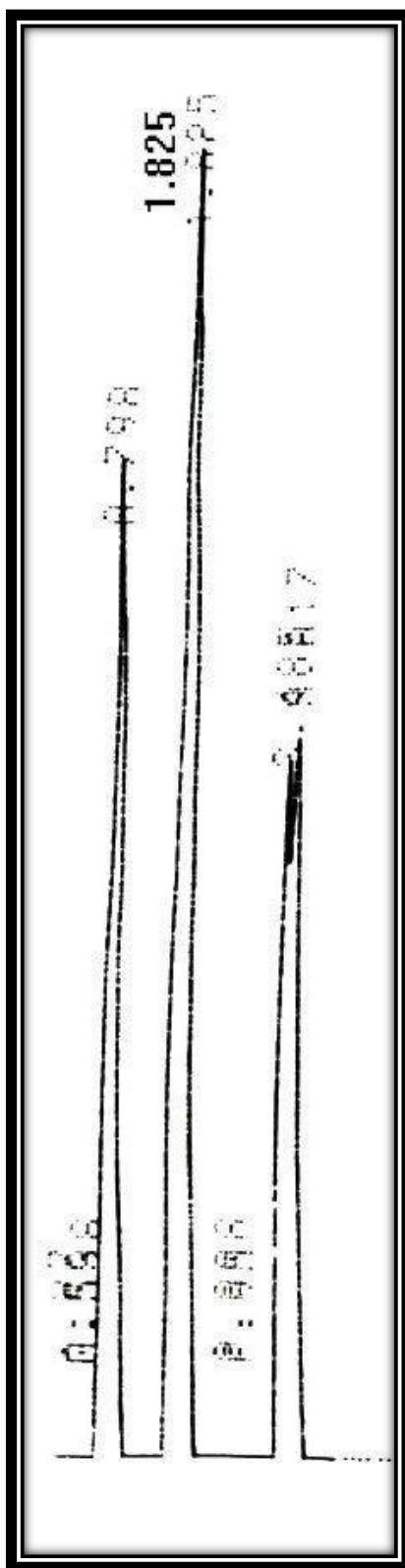
الجدول (14) : زمن احتباس مركب Steviosid المعزول ونسب وجوده في عينات نبات ستيفا.

تركيز المركب (مايكروغرام.مل ⁻¹)	مساحة حزمة النموذج	زمن الاحتباس	المصدر
100%	134027	1.852	القياسية Steviosid
1.084	117169	1.825	الورقة
2.056	222113	1.780	الكالس
1.252	135347	1.828	4
0.712	76968	1.923	6
0.476	51444	1.878	10
1.554	167956	1.805	13
1.254	135528	1.817	15
2.429	262429	1.810	16
2.614	282421	1.780	20

* منشآت الكالس

* العينات ممثلة للمجاميع الوراثية أو الأنماط الوراثية حسب الدراسة الجزيئية في

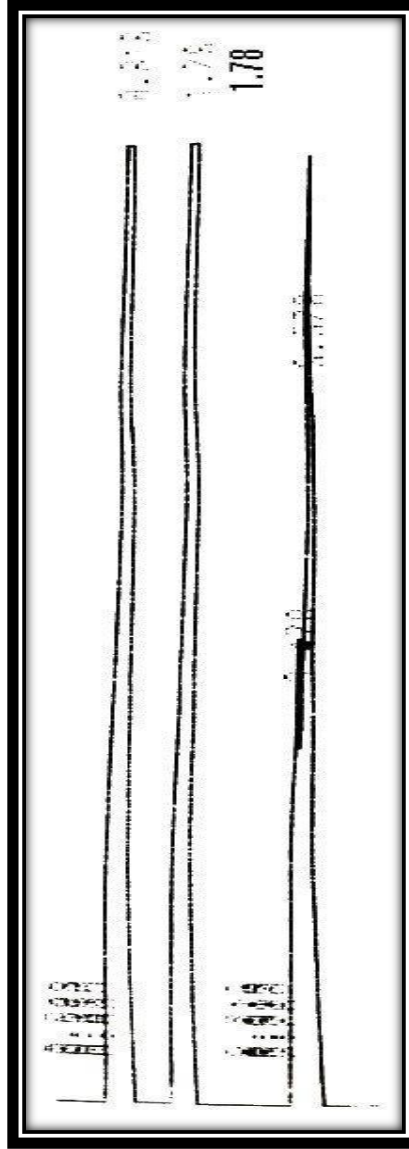
البحث



شكل (8): منحنى يمثل تركيز Steviosid في عينة ورقة نبات الام .

2-3-4 : عينة الكالس

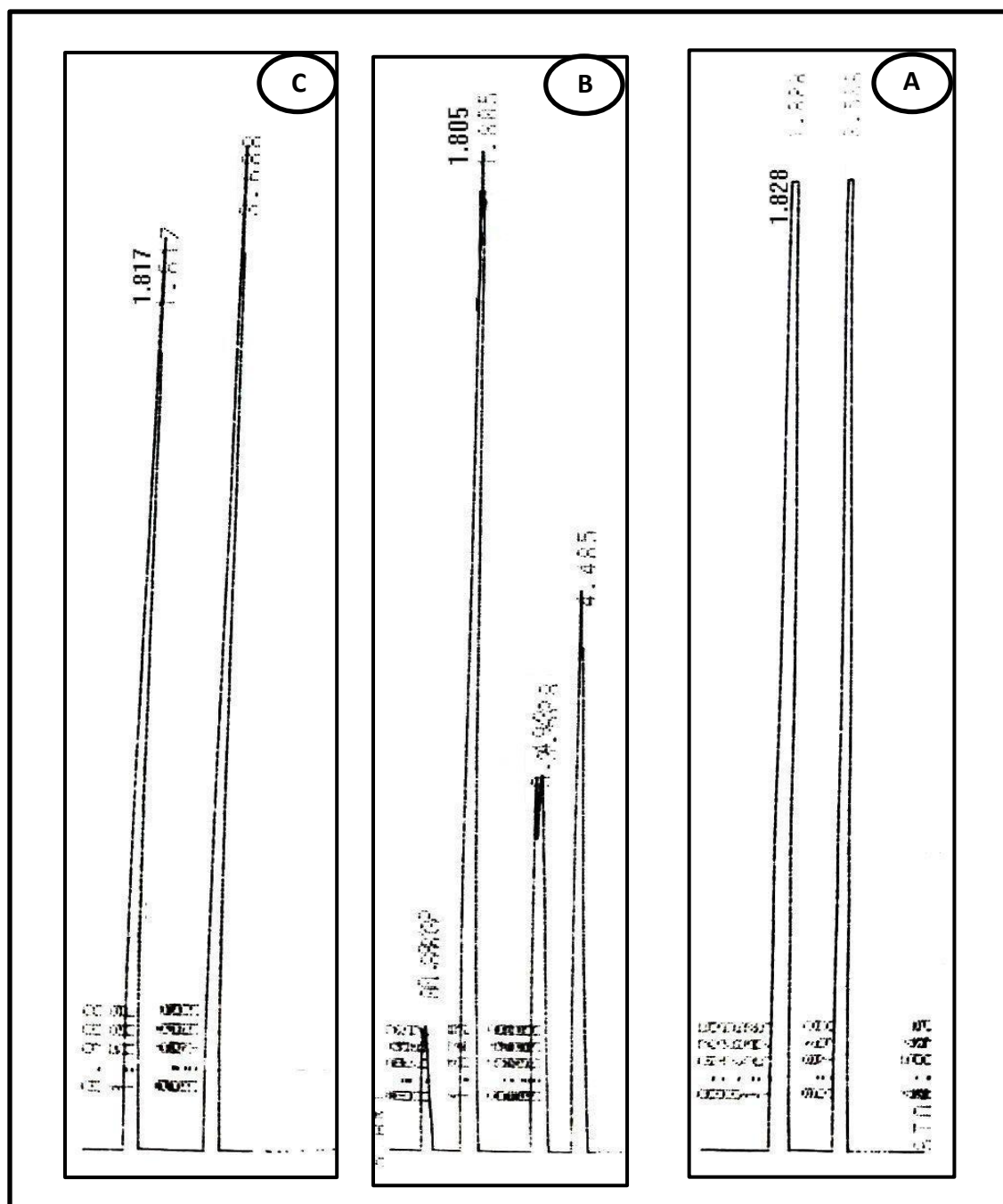
اظهرت نتائج التشخيص بواسطة تقنية HPLC (جدول 14) لمستخلص الكالس المستحث على وسط MS الصلب والمدعم بتركيز 2.0 ملغم.لتر⁻¹ NAA + 0.5 ملغم.لتر⁻¹ TDZ وبعمر 30 يوم، وجود مركب Steviosid ، إذ سجل قيمة بلغت 2.056 مايكروغرام.مل⁻¹ (شكل9) بدلالة زمن احتباس العينة بالمقارنة مع العينة القياسية .



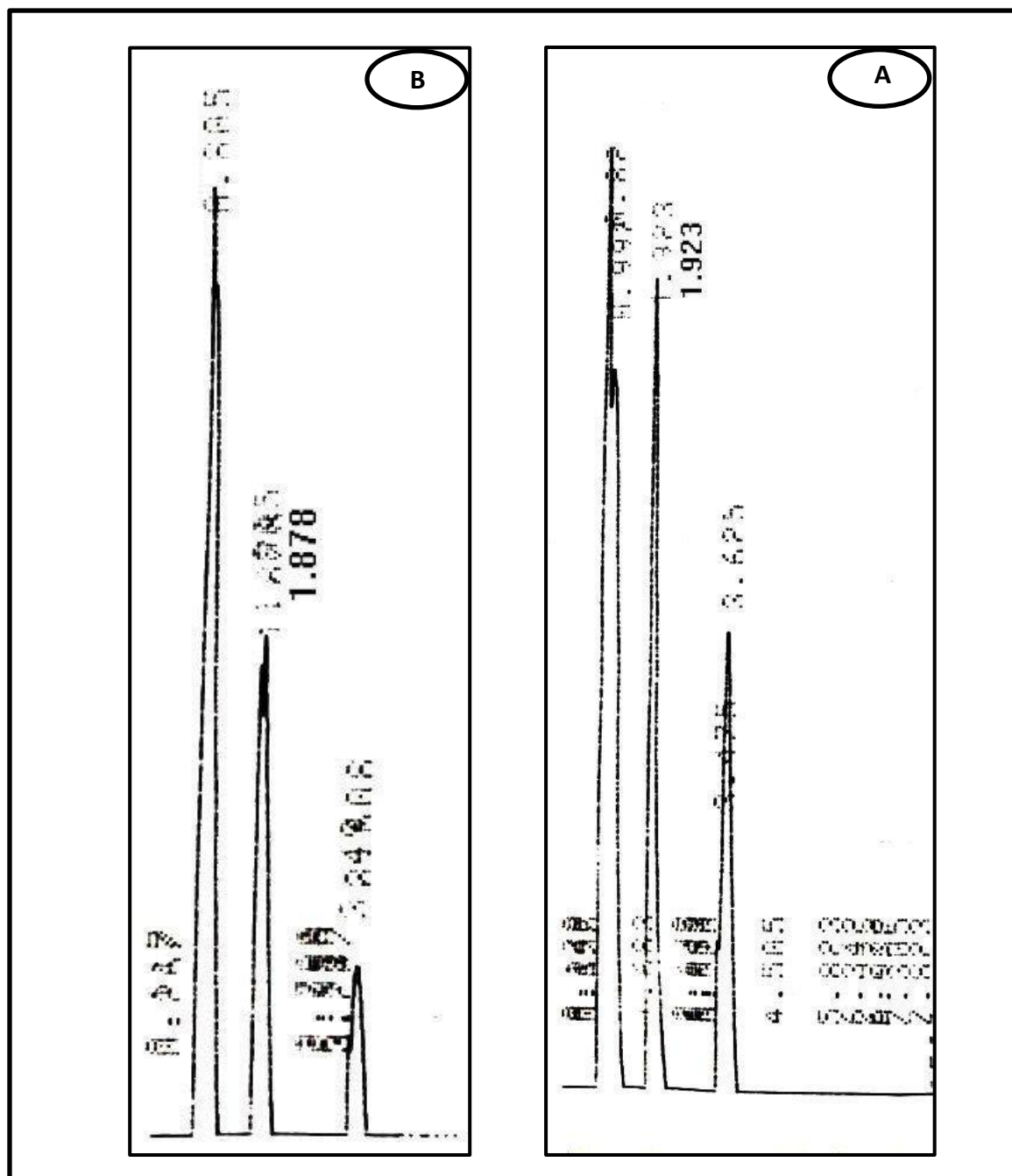
الشكل (9): منحنى يمثل تركيز Steviosid في عينة كالس المستحث من اوراق نبات *Stevia rebaudiana*

3-3-4 : محتوى Steviosid في الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية

أظهرت نتائج التشخيص بجهاز HPLC وجود مركب Steviosid في مستخلص عينات الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية بدلالة زمن إحتباسها بالمقارنة مع العينة القياسية (جدول 14) ، العينتان 16، 20 إزدادت تراكيز المركب فيها عن النبات الأم وبقيم تقترب من محتوى الكالس المستحث من أوراق النبات فقد بلغ محتواها من مركب Steviosid 2.429، 2.614 مايكروغرام.مل⁻¹ وعلى التوالي (شكل 12)، في حين أظهرت عينات الكالس للنسل ذو الرقم 6، 10 إحتوائها هذا المركب بتراكيز أقل من النبات الأم إذ بلغت قيمها 0.712 ، 0.476 مايكروغرام.مل⁻¹ (شكل 11) ، و انتجت عينات الكالس للأنسال ذات الأرقام 4 ، 13 و 15 (شكل 10) مركب Steviosid بتراكيز مقاربة للنبات الأم بلغت قيمها 1.252، 1.554 و 1.254 مايكروغرام.مل⁻¹ ، على التوالي .



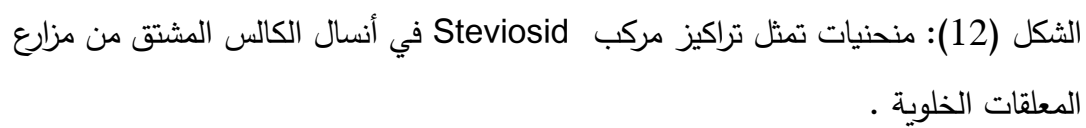
(C): الكالس رقم 15



الشكل (11) : منحنيات تمثل تراكيز مركب Steviosid في أنسال الكالس المشتق من مزارع المعلقات الخلوية .

(A): الكالس رقم 6

(B): الكالس رقم 10



(B): الكالس رقم 20

أشارت نتائج الكشف والتقدير لمركب Steviosid ان هناك تفاوت في تركيزه في الخطوط الخلوية لأنسال الكالس المشتقة من زراعة المعلقات الخلوية وقد يعود السبب في هذا التفاوت الى التباين الجزيئي بين أنسال الكالس ، وقد يعزى السبب في تباين إنتاج الأنسال من مركب Steviosid الى التباين الجزيئي لتلك الأنسال فقد سجل النسل 20 أعلى قيمة للاستيفوسيد بلغت 2.614 مايكروغرام.لتر⁻¹ والذي تقارب وراثياً مع النسل 15 لذا نرى أن نسبة الستيفوسيد في هذا النسل أخذت المركز الثاني بعد النسل 20 حيث كانت 1.254 مايكروغرام.لتر⁻¹ وقد بلغت قيمة الستيفوسيد في النسل 10 أقل قيمة سُجلت بين الأنسال قيد الدراسة بالرجوع الى الشجرة الوراثية نجد أن النسل 10 ينفصل عن باقي الأنسال ويتباعد وراثياً ، وتتصور الباحثة أن تركيز المواد الفعالة يتأثر وراثياً ، وأنتج النسل 6 والذي تقارب وراثياً مع النسل 10 بأنه يحتوي نسبة ستيفوسيد كان تركيزها 0.712 مايكروغرام.لتر⁻¹ ، يمكن القول بأن وجود التمايز الوراثي والتغاير في الأنسال يؤثر في نسبة المواد الفعالة حيث كلما أبتعدت الأنسال عن بعضها وراثياً كلما قلت نسبة المواد الفعالة في النبات وهذا يقودنا الى حقيقة التربية والتحسين (Kaplen و Turgut ، 2019) .

5-الاستنتاجات والتوصيات

5-1: الاستنتاجات

1- تم الكشف عن التغيرات الوراثية بين أنسال نبات ستيڤيا او بين الاجيال الناتجة منها بالامكان استعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال RAPD لسلسلة الدنا ، اذ تميزت هذه المؤشرات بسرعتها وسهولة تطبيقها .

2- إمتازت بعض الخطوط الخلوية من أنسال الكالس المشتقة من مزارع المعلقات الخلوية بمحتواها المرتفع من مركب Steviosid وهي التي كانت مختلفة وراثياً عن بقية الأنسال مثل النسل 20 .

5-2 : التوصيات

- 1- استخدام تقنيات اخرى للكشف عن البعد الوراثي بين النبات الام والأنسال الناتجة منها مثل دراسة على جين معين في النبات او استعمال تقنية ISSR وغيرها من التقنيات الاخرى .
- 2- دراسة التعبير الجيني للجين المسؤول عن التعبير عن مادة Steviosid .
- 3- إمكانية الكشف عن الأنسال المختلفة وراثياً عن طريق تقنية الـ RAPD وفحصها بشكل خاص للتعرف على محتواها من مادة Steviosid .

المصادر

المصادر العربية

أشتر ، سها عبد الرؤوف . (2008) . تقييم بعض الطرز الوراثية من الاقماح السورية (السداسية والرابعة) باستخدام معلومات بيوكيميائية وجزيئية مختلفة . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة تشرين . الجمهورية العربية السورية .

البطل ،نبيل، خليل المعري، فهد البسكي، طارق السمعان، وصف الدين سليمان، سلام لاوند (2011).الورد الشامي البري في سوريا :دراسة تنوعه الوراثي، إكثاره، حفظه، نسبة الزيت واستثماره .كلية الزراعة- جامعة دمشق.

الجبوري، كاظم ديلي حسن، جنان قاسم حسين، سامي كريم محمد امين .(2009) التغيرات الوراثية للشبوي الناتجة عن الصعق الكهربائي بأستخدام تقانة RAPD .مجلة العلوم الزراعية العراقية المجلد- 40 ، العدد(5) .111-123

العيدي ، علا موجد عبد الزهرة وخير الله حسام سعد الدين محمد (2017) . دور بعض منظمات النمو في تضاعف افرع نبات Stevia خارج الجسم الحي . مجلة العلوم الزراعية العراقية 48 (5) : 1158-1168 .

العزاوي ، مصطفى عبد الكريم مصطفى (2020). تأثير كثافة زراعة المعلقات الخلوية لنبات ورق السكر *Stevia rebaudiana* Bertoni في تكوين بادئات الكالس ومحتواها من Stevioside . رسالة ماجستير ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة ديالى ، العراق .

- السنجري**، رعد عبد الغني(2009). التعرف على لحوم الابقار بواسطة تقنية تباين اطوال قطع التقييد للتفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) ألمجلة العراقية للعلوم البيطرية- المجلد 23 ، العدد(1): 43- 46 .
- الصميدعي** ، كاظم محمد إبراهيم (2017) . تطبيقات في التقانات الاحيائية النباتية ، الجزء الاول ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
- المحمد** ، خالد ومحمد نبيل الايوبي وزكريا حساني وأميرة زين (2003) . التحسين الوراثي للخضار والفاكهة . منشورات كلية الزراعة - جامعة حلب . سوريا . ص 270.
- حسين** ، جنان قاسم . (2011) . البعد الوراثي لأنواع ورد بإستخدام RAPD . مجلة العلوم الزراعية العراقية - المجلد 42 ، العدد (2) : 71- 79 .
- حسين** ، جنان قاسم . (2015) . التوصيف الجزيئي والمظهري لبعض انواع القرنفل . مجلة العلوم الزراعية العراقية - 46 (5) : 793-801 .
- حمد الله**، ماجد شايح. (2009) . دور التقانات الجزيئية في رسم الخرائط الوراثية وتقدير التباعد الوراثي والبصمة الوراثية. مجلة العلوم الزراعية العراقية - المجلد 30 ، العدد(4) : 50- 62 .
- سلمان**، محمد عباس 1988. أساسيات زراعة الانسجة والخلايا النباتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.

- Abdel-Mawgood, A.L.; Jakse, J.; Al-Doss, A.A. and Assaeed, A.M.(2010).** Genetic structure and diversity with in and among six population of *Capparis decidua* (forssk.) edgew. from Saudi Arabia. Afri. J. Bio. 9(38) : 6256-6263.
- Abdul – Rahman, T.; Abdelwahed, M. A.; Elsaid, M. A. E. E., and Ei-Beih, A. A.(2015).** Free calorie sweetness and antimicrobial properties in *Stevia rebaudiana*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6 (5): 669–679.
- Abo Elnaga, N. I. E.; Massoud, M. I.; Yousef, M. I., and Mohamed, H. H.A.(2016).**Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats. Annals of Agricultural Sciences, 61(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.11.008>
- AL-Anbari, A.K.; Kanawapee, N.; AL-Kazragi, T.A.; AL-Jewari, H.; AL-Mashhadani, A.; Barusrux, S.; Pornpongrungrueng, P. and Theerakulpisut, P. (2014).** Genetic diversity of citrus (Rutaceae) in Iraq based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Afri. J. Agric. Res. 9(11): 1012-1019.
- Allam ,AI.; Nassar, A.M. and Besheite, S.Y. (2001).**Nitrogen fertilizer requirement of *Stevia rabaudiana* Bertoni under Egyptian condition. Egypt J. Agric. Res ,79: 1005–1018.
- Amom, T.; Tikendra, L.; Rahaman, Nongdam, P., (2018).** Evaluation of genetic relationship between 15 bamboo species of North-East India based on ISSR marker analysis. Molecular Biology Research Communications 7(1):7-15.
- Anand, L.(2006).** Assessing diversity using molecular and other techniques in tropical fruit crops. *Trends genet.*, 112: 374-380.
- Bardakci, F. (2001).**Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk. J. of Bio., 25(2):185-196.
- Bastianel, M.; Dornelles, A.L.C.; Antonio, M.; Wickert, M.E.; Maraschin, S.F.; Filho, H.D.C. and Schafer, G. (2006).**

- Characterization of *Citrus* genotypes (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Univ. Fed. San. Ma., 77: 501-511
- Beemnet, M.K.; Zigene,Z.D.; Kebede, W. and Gebremeske, H.(2012).** Performance of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) For Morphological and economic traits under different ecologies of Ethiopia. J.AD.,2(2):1-16.
- Bhatia R.; Singh K.P.; Sharma T.R and Tripta J.(2011).** Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 131–135.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O. and Nosov. A. (2001).** Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia Rebaudiana* Bertoni . Plant Sci. 161 : 155-163.
- Bornet, B. and Branchard, M.(2001).** Non anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers : reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology reporter ; 19 : 209-215.
- Borsai, O.; Harta, M.; Szabo, K.; Kelemen, C.D.; Andrecan, F. A.; Codrea, M.M.; and Clapa, D.(2020).** Evaluation of genetic fidelity of *in vitro*-propagated blackberry plants using RAPD and SRAP molecular markers. Horticultural Science (prague) , 47, (1); 21-27.
- Bukhari, A.; Bhat, M. A.; Ahmad, M. and Saleem, N. (2015).** Examination of genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers . African Journal of Biotechnology .14(6) : 451-458.
- Brandle, J. E.; Starratt, A. N. and M. Gijzen. (2000).** *Stevia rebaudiana*: its biological, chemical and agricultural properties. Retrieved from <http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/ste> via_rev. html.

- Brandle, J.E. and Telmer, P.G. (2007).** Steviol glycoside biosynthesis
Phytochemistry, 68: 1855–1863.
- Brar ,D. S. amd S. M. Jain(1998).** Somaclonal Variation : Mechanism and
Applications In Crop Improvement. In: Somaclonal vaviation and
induced mutations in crop improvement. (Eds.) : S. M. Jain, D. S.
Ahloowalia. Kluwer Academic Publishers. London England pp: 15-
37.
- Cacciola, F; Delmontea P; Jaworska K; Dugo P.; Mondello L. and
Rader J.(2011).** Employing ultra-high-pressure liquid
chromatography as the second dimension in a comprehensive two-
dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. J.
Chromatography, 1218: 2012–2018.
- Ceunen,S. and Geuns,J.M.C.(2013).** Steviol glycosides: chemical
diversity, metabolism, and function, J. Nat. Prod. 76 (6) :1201–1228.
- Choi, Y. H.; Kim, I. ;Yoon, K.D.; Lee, S.J. ; Kim, C.Y. and Yoo, K.P.
(2002).** Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-
electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia
rebaudiana* leaves. Chromatographia 55(9– 10):617–620.
- Dalmasso, A.; Fontanella, E.; Piatti, P.; Civera, T.; Rosati, S. and
Bottero, M. (2004).** multiplex PCR assay for identification of
animal species in feedstuffs. Mole Cell Probes., 18 :81-87.
- Davies, K.M. and Deroles, S.C. (2014).** Prospects for the use of plant cell
cultures in food biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 26, 133–
140 Vis., 11(3):116-124.
- Devi, P. (2003).** Principles and Methods in Plant Molecular Biology,
Biochemistry and Genetics. 3rd ed. Updesh Purohit Pub., Jodhpur,
India.
- Dhutmal, R.R.; Mundhe, A.G and More, A.W. (2018).** Molecular markers
techniques: areview. Int J Curr Microbiol App Sci Issue 6:816–825
- Dholakia, B. B.; Ammiraju, J. S. S.; Santra, D. K.; Singh, H.; Katti, M.
V.;Lagu, M. D.; Tamhankar, S. A.; Rao, V. S.; Gupta, V. S.;**

- Dhaliwal, H. S. and Ranjekar, P. K. (2001).** Molecular marker analysis of protein content using PCR-based markers in wheat. *Biochemical Genetics*; 39 : 325-338.
- Ghaheri, M.; Kahrizi, D.; Bahrami, G.h.; (2015).** Effect of mannitol on some morphological characteristics of in vitro *stevia rebaudiana* Bertoni. *Biharian Biologist*; (online first): art. 151415
- Ghosh, S. and Mandi, S.S. (2018).** Altitudinal effect in active principle content in *Murraya koenigii* (L) correlated with DNA fingerprinting study. *Journal of Medicinal Plants Studies* 6:20–26
- Hanacek, P.; Havel, L. and Truksa, M. 2002.** Characterization and determination of genetic stability of early somatic embryo culture clones of Norway spruce using RAPD markers. *Biologia*, 57: 517-522.
- Han, Y.; Liu, X.; Benny, U.; Kistler, H. C. and Venetten, H. D.(2001).** Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *the plant journal*; 25 (3): 1-11.
- Islam, M.; Habib, A.; Khan, S.; Akter, S.; Goswami, B.; Khan, H. and Banu, T.A. (2020).** Molecular characterization of oil seed *Brassica* using RAPD markers . *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 55(1): 1-8 .
- Jayaraman, S .; M.S. Manoharan, M.S.; and Lllanchezian, S.(2008).** In vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts. *Tropical Journal of pharmaceutical Research* 7(4):1143-1149.
- Kantia, A. and Kothari, S.L. (2002).** High efficiency adventitious shoot bud Formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus Chinensis* L. *Sci. Hortic.*, 96: 205-212.

- Kaplan,B. and Turgut, K. (2019).** Improvement of rebaudiana A diterpene glycoside content in *Stevia rebaudiana* Bertoni using clone selection .Turk. J. Agric. For. 43 : 232-240.
- Khan, S.; Bhagat, J.; Shirwaikar, A. and Parmar. V. (2011).** Identification and estimation of stevioside in the commercial samples of stevia leaf and powder by HPTLC and HPLC. International Journal of Pharmacy and Life Sciences., 2(9):1050-1058 ISSN: 0976-7126.
- Khouildi, S.; Pagnotta, M.A.; Tanzarella, O.A.; Ghorbel, A. and Porceddu, E. (2002).** Suitability of RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique for estimating the genetic variation in natural genotypes of Tunisian and Italian caper (*Capparis spinosa* L.). Agric. Medi. 130(1) : 72-77.
- Kumar, A. and Verma, N. (2012).** A comparative phylogenetic analysis of medicinal plant *Tribulus terrestris* in Northwest India revealed by RAPD and ISSR markers. Bio Diversitas; 13(3): 107-113.
- Kumar, N. S. and Gurusubramanian, G. (2011).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. Sci.
- KureK, J.M. and Krejpcio, Z. (2019).** The functional and health-promoting Properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its glycosides with special focus on the antidiabetic potential . Journal of functional foods. Vol: 16.
- Lakshmanan, V.; Venkataramareddy, S.R. and Neelwarne. B. (2007)** Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. Electronic J. Biotech 10:1–8.
- Lenis , L.A. ; Ruales, C. and Benitez , R. (2013).** Determination of Glycosides , in honey of *Stevia (Stevia rebaudiana)* by liquid chromatography .Bio. Agro.vol.11 . 1692-3561.

- Lipp, M.; Shillito, R.; Giroux, R.; Spiegelhalter, F.; Charlton, S.; Pinero, D. and Song, P. (2005).** Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88(16) : 136-155.
- Lyakhovkin, A.G., T.D. Long, D.A. Titov and M.P. Anh (1993).** Cultivation and Utilization of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni (pp.1–44). Hanoi: Agric. Publishing House.
- Lutsenko, N.; Mironyak, V.; Labyak, M. A.; Volnyanska, O. V. and Tkach, V. I. (2016).** Determination of the total content of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* plant by the method of direct potentiometry. *Pelagia Research Library*,. 7 (1): 9–19.
- Ma, L. and Yan, S. (2009).** Identification of *Stevia rebaudiana* Bertoni Protein by Sodium Dedecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Asian Journal of Crop Science*. 1(1): 63-65.
- Mathur, S. and Shekhawat, G.S. (2013).** Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture : An *in vitro* Approach for production of steviosid. *Acta Physiol. Plant*. 35: 931- 939.
- Mathur, M., and Begum, T. (2015).** Shootlets Regeneration and Tissue Culture Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Terminalia bellerica* Roxb. *International Journal of Research of Biotechnology*, 3: (1) 25-35.
- Mizutani, K. and Tanaka, O. (2002).** Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In: A. D. Kinghorn (Ed.), Vol.19, pp. 178–195. *Stevia*, the Genus *Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profile London: Taylor and Francis.
- Miyagawa, H.; Fujioka, N.; Kohda, H.; Yamasaki, K.; Taniguchi, K. and Tanaka, R. (1986).** Studies on the tissue culture of *Stevia*

- rebaudiana* and its components. II. Induction of shoot primordia. *Planta Medicinal*, 52:321–323.
- Mohamad, A.; Alhasnawi, A.N.; Kadhimi, A.A.; Isahak, A.; Wan Yusoff, W.M. and Che Radziah, C.M.Z. (2017).** DNA Isolation and Optimization of ISSR-PCR Reaction System in *Oryza sativa* L. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 7(6):2264.
- Moktaduzzaman, M.D. and Rahman, S.M.M. (2009).** Regeneration of *Stevia rebaudiana* and Analysis of Somatic Variation by RAPD. *Biotechnology* 8(4) : 449-455.
- Mondaca, R.L., Gálvez, A.V., Bravo, L.Z. and Hen, K.A. (2012).** *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects *Food Chem* 132: 1121-1132.
- Mubarak ,M.H.; Belal, A.H.; Geddaw, I.H. and Nasr, M.I. (2008).** Meeting the Challenges of sugar crops and integrated industries in developing Countries. *Al-Arish, Egypt*, 293-298.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physical Plant*, 15: 473-497.
- Modi, A.R.; Patil, G.; Kumar, N.; Singh, A.S. and Subhash. (2012) .** A Simple and Efficient In Vitro Mass Multiplication Procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and Analysis of Genetic Fidelity of In Vitro Raised Plants Through RAPD .ISSN 0972-1525.
- Nilkanta, H.; Amom, T.; Tikendra, L.; Rahaman, H. and Nongdam, P. (2017).** ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. *Scientifica* 2017:1-9.
- Odenore, V.; Nwite, P. A.; Aghimien, E.G.; Obahiagbon, O. and Uwaifo, W.A. (2018).** Relatedness of Oil Palm Fruit froms using RAPD markers. *Corresponding Email : vonap 5@ yahoo.com .*

- Peng, J.; Xiao, X.; Hu, M. and Zhang, X. (2018).** Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease. *Life Sci.* 214: 153–157.
- Phillips, R.L.; Kaeppler, S.M. and P. Olhoft. P. (1994).** Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 5222–5226.
- Rajasekaran T.; Ramakrishna, A.; Sankar, K.U.; Giridhar, P. and Ravishankar, G.A. (2008).** Analysis of predominant steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by liquid chromatography/electrospray ionization- mass spectrometry. *Food Biotechnol* 22:179–188.
- Raji, M.R.; Lotfi, M.; Tohidfar, M.; Zahedi, B.; Carra, A.; Abbate, L. and Carimi, F. (2018).** Somatic embryogenesis of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers. *Protoplasma* 255:873–883. <http://doi.org/10.1007/s00709-017-1194-9>
- Ranjbar, T., and Masoumi, S. J. (2018).** The effect of *Stevia rebaudiana* on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): A review. *International Journal of Nutrition Science*, 3(1): 2–6.
- Rasenack, P. (1908).** Sweet substances of *Eupatorium rebaudianum* and of Licorice. *Arbeiten aus der biologischen Abteilung fuer Land- und Forstwirtschaft am Kaiserliche Gesundheitsamte* 28: 420-423.
- Razani, M.; Kayat, F.; Redwan, R.M. and Susanto, D. (2020).** RAPD Analysis of *Musa acuminata* cv. Berangan Plantlets in Nursery Stage from Long-term Subculture. *Pertanika j. Trop. Agric. Sc.* 43(2): 183-192.
- Reddy, M.P.; Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002).** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17
- Richman, A. S.; Gijzen, M.; Starratt, A.; Yang, Z and J. E. Brandle. (1999).** Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and

- up- regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal.*, 19(4): 411-421.
- Robarts, D.W. and Wolfe, A.D. (2014).** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences*, 2: 1400017.
- Saha, S.; Adhikari, S.; Dey, T. and Ghosh, P.(2016).** RAPD and ISSR based evaluation of genetic stability of micropropagated plantlets of *Morus alba L.* variety S-1. *Meta Gene* 7: 7-15.
- Salar, F.J.;Agullo, V.; Viguera, C.G., and Perles, R.D. (2020).** Stevia vs. Sucrose : Infuence on the Phytochemical Content of a Citrus-Maqui Beverage- A Shelf Life Study.
- Salehi, B.; Lopez, M.D. ; Martinez-Lopez, S.; Victoriano, M.;Sharifi-Rad, J.; Martorell, M.; Rodrigues, C.F. and Martins, N. (2019).***Stevia rebaudiana* Bertoni bioactive effects: From in vivo to clinical trials towards future therapeutic approaches. *Phytother Res* 33: 2904–2917.
- Samaha, N. A.; Hisham A. D. A. and Rahima, S.A. (2012).** Determination of Stevioside and Rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* Leaves via preparative High Performance Liquid Chromatography (prep-HPLC). *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*. 5:7-10. ISSN 2078-0737.
- Samantaray, S. and Maiti, S. (2010).** An assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Chlorophytum borivillianum* using RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 54: 334–338.
- Savita, S.M.; Sheela,K.; Sunanda,S.; Shankar, A.G. and Ramakrishnam,P.(2004).** *Stevia rebaudiana* –A Functional Component For Food Industry. *Journal of Human Ecology* . (4) : 261-264.

- Senapati, S.K.; Aparajita, S. and Rout, G.R.(2013).** Micropropagation and assessment of genetic stability in *Celastrus paniculatus*: an endangered medicinal plant. *Biologia*, 68: 627–632.
- Singh, S.D. and Rao, G.P. (2005).** Stevia: The herbal sugar of the 21st century. *Sugar Technol.* 7:17-24.
- Singh, P.; Dwivedi, P. and Atri, N.(2014).** *In Vitro* Shoot Multiplication of Stevia and Assessment of Stevioside Content and Genetic Fidelity of the Regenerants. *SugarTech.*, 16: 430–439.
- Singh, V.; Rajpurohit, D.; Sen, Y.; Joshi, A. and Sharma, A. (2017).** Thidiazuron Induced Direct Shoot Organogenesis in Stevia rebaudiana and Assessment of Clonal Fidelity of Regenerated Plants by RAPD and ISSR. *Manvendra Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* , 6(8): 1690-1702.
- Sivaram, L. and Mukundan. U. (2003).** *In vitro* culture studies on Stevia rebaudiana. *In vitro cell. Dev. Biol.-plant* 39:520-523.
- Smith, R. H. (2013).** Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press, pp:188.
- Soejarto, D.D.; Kinghorn, A.D. and Farnsworth N.R. (2002).** Potential sweetening agents of plant origin .II. Field search for Sweet tasting Stevia species . *Econ.Bot.*37:71-79.
- Sorkheh, K.; Shiran, B.; Aranzana, M.J.; Mohammadi, S.A. and Martinez-Gomez, P (2007).** Application of amplified fragment length polymorphism (AFLPs) analysis to plant breeding and genetics: Procedures, applications and prospects. *J. Food. Agric. Environ.* 5: 197–204.
- Sulange, J.G.; Ranghoo-Sanmukhiya, V.M.; and Seeburrun, S.D.(2007).** Tissue Culture and RAPD Analysis of *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum verum*. *Biotechnology* 6(2) : 239-244.

- Starrat, A.N.; Kirby, C.W.; Pocs,R. and Brandle,J.E. (2002).** Rebaudiosid F, aditerpene glycoside from *Stevia rebaudiana* phytochemistr 56(4) : 70-367
- Suanarunsawat, T.; Klongpanichapak, S.; Rungseesantivanon, S. and Glycemic, C.N. (2004).** Effect of stevioside and *Stevia rebaudiana* in strep tozotocin induced diabetic rats. Eastern Journal of Medicine. 9: 51-56.
- Swanson, S.M.; Mahady, G.B. and Beecher, C.W.W. (1992).** Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted shoot cultures in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult 28:151–157.
- Treben, M., (2000).** Health from the Pharmacy of the Lord, Advice and experiences with medicinal herbs, Ennsthaler Editor.
- Turgut, K.; Ucar, E.; Tutuncu, B. and zyiğit, Y. (2015)** .*Stevia rebaudiana* Bertoni could be an alternative crop in the Mediterranean region of Turkey. In: Proceedings of the 8th EUSTAS Stevia Symposium; Bonn, Germany. pp. 43-52.
- Ullah, S. M. S.; Amzad, H. M.; Musharaf, H. M.; Sumanta, B.; Mehadi, H. S. M. and Shamsul, H. P. (2013).** Genetic diversity analysis of chewing sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by using RAPD markers. J. BioSci. Biotech.; 2(2): 145-150.
- Vidal, M.; Garcia, E.D.; de-Vidal, M. and de-Garcia, E. (2000).** Analysis of *Musa spp.* somaclonal variant resistant to yellow sigatoka. Plant. Mol. Biol. Rep., 18: 23-31.
- Viloria, Z.; Calovic, M.; Nielsen, B.; Orbovic, V.; Gmittle, J.R.; Castle, W. and Grosser, J. (2002).** Detection of genetic variations in tissue culture derived lemon plants using RAPD and flow cytometry. *In vitro* Cell Dev. Biol., 38: 1263-1266
- V0s , P.; Hogers, R. ; Bleeker, M.; Van de Lee Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.;Kuiper, M. and Zabeau, M.(1995).** AFLP: anew technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acid. Res. 23(1): 4407-4414.

- Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993.** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704-740.
- Yadav,A.K.; Singh, S.; Dhyani, D. and Ahuja, P.S. (2011).** A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)] *Can. J. Plant Sci* .91: 1-27.
- Yadav, A.K. ; Singh, S. and Rajeev, R. (2014).** Self-incompatibility evidenced through scanning electron microscopy and pollination behaviour in *stevia rebaudiana* .*Indian Council of Agr.Res. ,New Delhi, India Ind.J.of Agr.Sci.* 84,(1) : 93-100.
- Yoneda, Y.; Shimizu, H.; Nakashima,H.; Miyasaka, J. and Ohdoi,K. (2017).** Effects of light intensity and photoperiod on improving steviol glycosides content in *Stevia rebaudiana* Bertoni while conserving light energy consumption, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 7 :64– 73.

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.

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 Ibrahim (Ph.D)

2021 A.D

Assistant Professor

Dr.Aseel Kadhim Hade(Ph.D)

1442 A.H