تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق

إحسان عرفان حسين **شيماء صباح مهدي**
جامعة بغداد/ كلية التربية للعلوم الصرفة – إبن الهيثم

الخلاصة

درس التباين الوراثي في 22 عينة محلية ومستوردة من ثمار الفلفل الحلو التي جمعت من الأسواق المحلية العراقية باعتماد تقانة تكرار التسلسل البسيط Single sequence repeat (SSR-PCR). استعملت ستة بوادئ في هذه الدراسة وأن هذه البوادئ قد انتجت 33 حزمة كان جميعها ذات حجمً جزيئي يتراوح بين 100 زوج قاعدة واكثر من 1500 زوج قاعدة، كان منها 24 حزمة متعددة الأشكال Polymorphic bands، بينما كان 9 حزم منها احادية الشكل Monomorphic bands. رسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على النتائج المتحصلة من البادئات وباستعمال تقانة SSR-PCR لعينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة وباستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي. بينت النتائج بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي في عشر مجاميع رئيسة. لقد اوضح هذا المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية الأخضر وبنسبة 1 وهي اعلى قيمة تشابه بالمقارنة مع اقل تشابه لعينة الفلفل الأسباني الطويل الأخضر وبقيمة 0.35. نسبة التشابه العالية قد ظهرت ايضاً بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأصفر والأحمر وبقيمة 0.98 وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/صويرة الأخضر وثمار الفلفل الحلو الأيطالي الأخضر وبقيمة 0.94. ثمار الفلفل الحلو الأيطالي البرتقالي والعراقي/بلد واليوسفية الأخضر (يقعان في نفس تحت المجموعة) اظهرا تشابهاً وبقيمة 0.88. ثمار الفلفل الحلو الأيطالي الأحمر والأيراني الأحمر قد اظهرا تشابهاً بقيمة

0.72. المجاميع الرئيسة الثلاثة الأولى قد اظهرت تشابهاً بعيداً عن بقية العينات الأخرى وبقيمة 0.26. قدر البعد الوراثي بين عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة اعتماداً على نسبة التشابه باستعمال معامل أحصائي هو Euclidean coefficient. اظهرت النتائج بأن اعلى قيمة بعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد الأخضر والفلفل العراقي/يوسفية الأخضر وعينة الفلفل الأيراني البرتقالي وبقيمة 5.656، بينما كان اقل بعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو الأردني الأخضر والأردني الأصفر إذ كانت القيمة مساوية إلى 1.0. بقية عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة فقد تراوحت قيم ابعادها الوراثية بين 1.0 و5.656.

الكلمات المفتاحية: التباين الوراثي، *Capsicum annuum* L. ، تكرار التسلسل البسيط SSR ، الفلفل الحلو الجرسي

المقدمة

مقدار التنوع الوراثي للأنواع يعد اساساً لبقائه وتكيفه في مختلف البيئات، وأن تغاير المادة الوراثية للسلالات يعد واحداً من اهم المعايير لأنتقاء الآباء من اجل الحصول على صفات مرغوبة في النبات (Oh *et al.*, 2012 ; Dhaliwal *et al.*, 2014). ان مستوى التعدد الشكلي Polymorphism في المادة الوراثية الراقية Elite germplasm يكون احياناً محدوداً وغير كاف ليسمح بالتمييز بين النمط الوراثي Genotype والضرب Variety (Geleta *et al.*, 2005). الجهود المبذولة لحماية المصادر الوراثية النباتية قد تطورت حديثاً عبر العالم وذلك لغرض مساعدة المزارعين في الأستجابة للتغيرات المناخية Climate changing (FAO, 2010). حماية النموات البرية Wild accessions هي غاية لمنع فقدان الأنماط الوراثية البرية عبر العالم (Nicolaì *et al.*, 2013)، وأن تضييق القاعدة الوراثية للأنواع البرية ظهر عند تحويلها إلى انواع مدجنة وكذلك عند استبدال السلالات الأصلية بالمزروعات الحديثة Modern cultivars (Tanksley and Mc couch, 1997)، إذ ان هذه السلالات ذات تغاير وراثي كبير ولها تكيف بيئي افضل (Lanteri and Barcaccia, 2006). وبالرغم من كون الفلفل من اكثر الخضراوات المستزرعة، لكنه لم يحظ بدراسة كافية من الناحية الوراثية والجزيئية مقارنة بالمحاصيل الأخرى، إذ ان الصعوبة تكمن في ايجاد واصمات وراثية جيدة لدراسة الفلفل لأن مجينه عالي الثبات DNA markers Highly conserved

خصوصاً الفلفل المستزرع الذي يعتبر اقل تنوعاً من الأشكال البرية فضلاً عن ان الفلفل الحلو ذا الثمرة الكبيرة يظهر تنوعاً قليلاً مقارنة بتنوع ثمرة الفلفل الحار الصغيرة (Kochieva and Ryzhova, 2003). التنوع الوراثي وتشخيص مزروع الفلفل قد درس في العديد من الدراسات باستعمال العديد من الطرائق وفي الوقت الحاضر هناك عدد من الطرائق المستعملة في تقييم التنوع الوراثي (Zhang *et al*., 2007) منها الصفات المظهريةMorphological characteristics، تحليلات علم الأنساب Analysis of genealogy، الواصمات الكيميائية الحيويةBiochemical markers وواصمات الدنا الجزيئية Molecular DNA markers. الواصمات الجزيئية Molecular markers التي تعد الأفضل في فهم المجين والتغاير الجيني، وكذلك في توضيح العلاقات الجينية بين الأنماط الجينية Genotypes لكونها غير متأثرة بالعوامل البيئية، وكما انها تكون سريعة وأكثر كفاءة في كشف الفروقات بين النباتات بشكل اكثر من الصفات المظهرية (Hayden *et al*., 2010). استعملت العديد من الواصمات الجزيئيية في دراسة التنوع الوراثي في الفلفل مثل AFLP (Vose *et al*., 1995 ; Paran *et al*., 1998 ; Toquica *et al*., 2003) ، RFLP (Prince *et al*., 1992 ; Prince *et al*., 1995) ، SSR (Hanáček *et al*., 2009) وRAPD (Sitthiwong *et al*., 2005 ; Thul *et al*., 2011). تعد تكرارات التسلسلات البسيطة SSR او التوابع Microsatellites من اكثر الواصمات الوراثية استعمالاً في تشخيص اختلافات وتنوع النباتات خصوصاً في الأنواع المدجنة Cultivated species ذات التعدد الشكلي القليلLow polymorphism وكذلك في تحديد خرائط الصفات الكمية Mapping quantitative traits وانتخاب الصفات المرغوبة بواسطة الواصمات Marker assisted selection (Varshney *et al*., 2005 ; Dhaliwal *et al*., 2014). تكرار التسلسل البسيط SSR عبارة عن تسلسل من قطع الدنا DNA قصيرة ومتكونة من 2−5 زوج قاعدي وتتكرر من 5-50 مرة (Turnpenny and Ellard, 2005). هذه الواصمات مفيدة جداً في دراسات التحليلات الوراثية Genetic analysis للنباتات والحيوانات، وذلك لتغايرها وتنوعها العالي وسهولة تقصيها بوساطة تفاعل البلمرة المتسلسلPolymerase chain reaction (PCR)، إذ انها ذات اشكال اليلية متعددة الأشكال Multi allelic forms، قابلة للتكرار Reproducible وذات سيادة

مشتركة Co-dominant مقارنة بالواصمات الأخرى (Litt and Luty, 1989 ; Jacob *et al.*, 1991 ; Edwards *et al.*, 1991 ; Powell *et al.*, 1996 ; Weising *et al.*, 2005 ; Soni *et al.*, 2010)، وهي موجودة في معظم مجن Genomics حقيقية النواة ومنتشرة في جينات الفلفل، كما ان المناطق الملاصقة للـ SSR محفوظة بين الأنماط الوراثية لنفس النوع (Tam *et al.*, 2005 ; Oue *et al.*, 2012). من اجل تطوير واصمات الـ SSRs المستعملة مع جنس *Capsicum* spp.، فقد عزلت نيوكليوتيدات قصيرة Oligonucleotides وهي (AT)15، (GA)15، (GT)15، (ATT)10 و(TTG)10 واستعملت كمجسات Probes وقورنت مع جينات الفلفل الموجودة في المكتبات الجينية Genomic libraries وقاعدة بيانات بنك الجينات Base gene bank data، وقد وجد ان كلاً من (GT)15 و(GA)15 قد ظهرت بتردد عال في جينات الفلفل تليها التكرارات (TTG)10 ثم (AT)15، وبذلك فقد طور 36 واصماً من SSR، كما اظهرت الواصمات الموجودة في جنس الفلفل والمحفوظة في المكتبات الجينية محتوى عالياً من معلومات تعدد الأشكال Polymorphism information contents بمقدار مرتين اكثر من قيمة الواصمات الموجودة في بنك الجينات (Lee *et al.*, 2004). ان استعمال الواصم الجزيئي تكرار التسلسل البسيط Single sequence repeat (SSR)في تفاعلات البلمرة المتسلسل لغرض ايجاد التباينات على مستوى مجين الدنا للتحري عن العلاقات التطورية قد استعمل بشكل واضح (Rodrigues *et al.*, 1999 ; Ince *et al.*, 2010). استعملت الواصمات الجزيئية SSR في دراسات التباين الوراثي في الفلفل (Lee *et al.*, 2004 ; Kwon *et al.*, 2005 ; Minamiyama *et al.*, 2006 Nagy *et al.*, 2007 ; Hanáček *et al.*, 2009 ; Thul *et al.*, 2011 ; Nicolaì *et al.*, 2012 ; Oh *et al.*, 2012) لكون هذه التقانة تعطي تبايناً عالياً، وكذلك تعطي تباينات للأليلات ذات السيادة المشتركة وللأليلات المتعددة (Becher *et al.*, 2000).

المواد وطرائق العمل

عينات ثمار الفلفل الحلو

جمعت 22 عينة من ثمار الفلفل الحلو Bell pepper المحلية والمستوردة من الأسواق المحلية العراقية في محافظة بغداد وصنفت بالأعتماد على شكل الثمرة لعدم

وجود السيقان والأوراق النباتية ولم يتسنَ لنا معرفة فيما أذا كانت العينات ضروب مستزرعة أو نباتات محورة وراثياً لعدم معرفة المصدر الحقيقي للبلد المصدر لتلك الثمار (جدول 1).

جدول (1): العينات المدروسة المحلية والمستوردة والمتحصل عليها من السوق العراقية في محافظة بغداد

ت	نوع ومصدر أنتاج العينة	لون الثمرة
1	فلفل اردني	برتقالي
2	فلفل اردني	احمر
3	فلفل اردني	اصفر
4	فلفل اردني	اخضر
5	فلفل اسباني	اخضر
6	فلفل عراقي/بلد	اخضر
7	فلفل عراقي/يوسفية	اخضر
8	فلفل صيني	احمر
9	فلفل عراقي/صويرة	اخضر
10	فلفل صيني	اصفر
11	فلفل صيني	برتقالي
12	فلفل اسباني طويل	اخضر
13	فلفل ايراني	احمر
14	فلفل ايراني	برتقالي
15	فلفل ايراني	اصفر
16	فلفل ايطالي	احمر
17	فلفل ايطالي	برتقالي
18	فلفل ايطالي	اصفر
19	فلفل ايطالي	اخضر
20	فلفل اسباني	احمر
21	فلفل اسباني طويل	أحمر
22	فلفل ايراني	أخضر

دارئ أستخلاص الدنا DNA extraction buffer

حضر هذا الدارئ بحسب طريقة Kang and Yang (2004) من Tris-HCl بتركيز 100 ملي مولر وEDTA بتركيز 50 ملي مولر وNaCl بتركيز 500 ملي مولر و β-mercaptoethanol بتركيز 10 ملي مولر وذي اس هيدروجيني مقداره 7.5.

محلول الأكريلمايد: المثيلينبس أكريلمايد الخزين Acrylamide: Methylenbisacrylamid (19:1)

حضر هذا المحلول الخزين بتركيز 40% وذلك بإذابة 38 غرام من Acrylamide مع 2 غرام من Methylenbisacrylamid في 100 مللتر من الماء المقطر المعقم.

هلام متعدد الأكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation

حضر هذا الهلام بأذابة 45 غراماً من اليوريا Urea (7.5 مولر) في 10 مللتر من دارئ TBE بتركيز 10X و15 مللتراً من المحلول الخزين Acrylamide: Methy lenbisacrylamid (19:1) الذي تركيزه 40% في حالة تحضير هلام بتركيز 6% واكمل الحجم إلى 100 مللتر بالماء المقطر. اضيف لكل 10 مللتر من هذا الهلام 50 مايكرولتر من المحلول الخزين Ammonium persulphate (APS) بتركيز 10% و30 مايكروليتر من محلول Tetramethylethylene diamine (TEMED).

البوادئ المستعملة في تجارب SSR-PCR

استعمل ستة بوادئ خاصة بدراسات SSR-PCR وبحسب المصدر (Nagy *et al.*, 2007)، والخاصة بدراسات التنوع الوراثي في الفلفل (جدول 2).

جدول (2): البوادئ المستعملة في تجارب SSR-PCR على عينات الفلفل الحلو

ت	أسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)
1	EPMS342	**F:** 5′-CTGGTAGTTGCAAGAGTAGATCG- 3′ **R:** 5′-ATGATCTTTGACGACGAGGG- 3′
2	EPMS397	**F:** 5′-GCACCCTCCCAATACAAATC- 3′ **R: 5′**-GATCACGGAGAAAGCAAAGG- 3′
3	EPMS426	**F:** 5′-GAGGAAACACTCTCTCTCTCTCTC- 3′ **R:** 5′-TCAAGAGACCCCAAATAGGG- 3′
4	EPMS501	**F:** 5′-AATCCTCCAAATCCACCCTC- 3′ **R:** 5′-ATTCGATTGCTTGCTCCTTG- 3′
5	GPMS29	**F:** 5′-CAGGCAATACGGAGCATC- 3′ **R:** 5′-TGTGTTGCTTCTTGGACGAC- 3′
6	GPMS161	**F:** 5′-CGAAATCCAATAAACGAGTGAAG- 3′ **R:** 5′-CCTGTGTGAACAAGTTTTCAGG- 3′

معلمات الوزن الجزيئي للدنا

استعمل المعلم الجزيئي Molecular marker المصنع من قبل شركة Promega بحجم كلي 1500 زوج قاعدة وبدرجات 100 زوج قاعدة. استعمل هذا المعلم الجزيئي الوراثي في جميع تجارب التنوع الوراثي للفلفل وباستعمال الواصمات الجزيئية اعلاه وذلك لصغر قطع الدنا المتحصل عليها.

استخلاص الدنا الكلي من ثمار الفلفل الحلو Bell pepper

استخلص الدنا الكلي من ثمار الفلفل الحلو بحسب طريقة Kang and Yang (2004) مع بعض التحويرات. اخذ 1 غرام تقريباً من ثمار الفلفل الحلو المجفف

باستعمال النتروجين السائل Liquid nitrogen ووضع في انبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مللتر. سحقت انسجة ثمار الفلفل الحلو في 100 مايكرولتر من دارئ استخلاص الدنا DNA extraction buffer باستعمال قضيب بلاستيكي لمدة من 15–20 ثانية. اضيف 300 مايكرولتر اضافي من دارئ استخلاص الدنا وسحقت ايضاً انسجة ثمار الفلفل لمدة من 15–20 ثانية وكما في اعلاه. اضيف 40 مايكرولتر من محلول SDS بتركيز 20% وتم خلطه بالهزاز Vortex لمدة 30 ثانية. حضنت العينة تحت حرارة 65 ^{o}م لمدة 15 دقيقة لغرض تحليل الخلايا. اضيف 10 مايكرولتر انزيم من DNase-free RNase A من المحلول الخزين 10 ملي غرام/مللتر وحضنت تحت حرارة 37 ^{o}م لمدة 60 دقيقة. اضيف 200 مايكروغرام من انزيم Proteinase K أو 10 مايكرولتر من المحلول الخزين 20 مليغرام/مللتر وحضنت تحت حرارة 50 ^{o}م لمدة 60 دقيقة. اضيف حجم متساو الى العينة من خليط Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) وخلطت باستعمال الهزاز لمدة 30 ثانية ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 ^{o}م. نقل الجزء الطافي الى انبوبة Eppendorf جديدة واستخلص الدنا مرة اخرى مع خليط Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 ^{o}م ونقل الجزء الطافي الى انبوبة جديدة. اضيف 500 مايكرولتر من الكلورفورم ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 ^{o}م لغرض التخلص من الفينول المتبقي، ويمكن اعادة هذه الخطوة مرة اخرى. نقل الجزء الطافي الى انبوبة اختبار جديدة واضيف 1/10 من حجم العينة من مادة خلات الصوديوم NaOAc بتركيز 3 مولاري واضيف حجمان من مادة الأيثانول Ethanol ايضاً بتركيز 95% وخلط جيداً وحضنت العينة عند حرارة 20- ^{o}م لمدة 30 دقيقة لغرض ترسيب الدنا. نبذت العينة مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة تحت حرارة 4 ^{o}م. تخلص من الجزء الطافي وغسل الجزء الراسب (الدنا) باستعمال كحول الأيثانول بتركيز 70% ونبذت العينة مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 ^{o}م وتم التخلص من الجزء الطافي ومن ثم جففت العينة بتركها لمدة 10 دقائق في المختبر لغرض التخلص من الأيثانول المتبقي وعلقت مرة اخرى في 100 مايكرولتر من TE buffer (0.1 ملي مولار من مادة EDTA و10 ملي مولار من مادة Tris-HCl والأس الهايدروجيني لهذا

الدارئ 8، وحضر باستعمال الماء الخالي من انزيم النيوكليز المعقم Nuclease-Free water، وحفظت العينة بعد ذلك تحت حرارة 20- ºم.

التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة SSR-PCR

درس التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة تكرار التسلسل البسيط SSR-PCR. حضر الــخليط الأساس Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب المصدر Nagy *et al*. (2007)، مع بعض التحوير. حضر الــخليط الأساس Master Mix للبوادئ المستعملة تحت ظروف مبردة مع بعض التحويرات. استعمل Go Taq® Green Master Mix المزود من شركة Promega الأميركية بحجم 12.5 مايكرومللتر وبتركيز 1X والبادئ Primer بحجم 2.5 مايكرومللتر وبتركيز 1 مايكرومولر وقالب الدنا DNA template بحجم 2 مايكرولتراً وبتركيز 100 نانوغرام وكان الحجم الكلي للتفاعل 25 مايكرومللتراً. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف كانت لمسخ القالب Denature template بدرجة حرارة 94 ºم ولمدة 3 دقائق والمسخ الأبتدائي Initial denaturation بدرجة حرارة 92 ºم لمدة 60 ثانية والتحام البادئ Annealing بدرجة حرارة 60ºم ولمدة دقيقة واحدة والأستطالة Extension بدرجة حرارة 72 ºم لمدة دقيقة واحدة والأستطالة النهائيةFinal Extension بدرجة حرارة 72 ºم لمدة 7 دقائق. مراحل المسخ الأبتدائي والتحام البادئ والأستطالة كانت لــ 35 دورة. حملت 10 مايكرولتر من نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البوادئ أعلاه لعينات الفلفل الحلو وأضيفت لها 10 مايكرولتر من دارئ التحميل Loading buffer (فورمومايد بتركيز 98%، EDTA (pH 8) 10 ملي مولر، بروموفينول الأزرق بتركيز 0.005% وXylene cyanol بتركيز 0.005%). مسخ Denatured ناتج التفاعل تحت حرارة 95 ºم ولمدة 5 دقائق ومن ثم وضع مباشرة على الثلج. اخذ 5 مايكرولتر من هذا الناتج لكل عينة وحملت العينات في المكان المخصص لها على هلام المتعدد اكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation بتركيز 6%، كما حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. ورحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب بأتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولتاً ولمدة من 3–4 ساعات او الى ان تصل صبغة التحميل على بعد 2–3 سنتيمتراً من

اسفل الهلام وباستعمال محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) بتركيز 1X (حضر من الدارئ الخزين الذي كان بتركيز 10X والمزود من قبل شركة Promega الأميركية). صبغ هلام المتعدد اكريلمايد بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) بتركيز 10 مليغرام/مللتر لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

التحليل الأحصائي

حولت نتائج الحزم المتحصل عليها بتقانة SSR-PCR الى مصفوفة ثنائية البعد Two-dimensional matrix وذلك بأعطاء رقم 1 عند وجود الحزمة ورقم 0 لعدم وجودها. حللت النتائج باستعمال برنامج احصائي متخصصPast software ver. 1.92 (Hammer, 2001). درست العلاقة الوراثية بين ضروب الفلفل الحلو المدروسة باستعمال تقانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)، اذ درست شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي كما درس البعد الوراثي بالأعتماد على نسبة التشابهEuclidean coefficient بين عينات الفلفل الحلو المدروسة. حسبت النسبة المئوية لعدد الحزم المتعددة الأشكال Polymorphic bands بتقسيم عددها على عدد الحزم الرئيسة مضروباً في 100، بينما استخرجت كفاءة التوافق بين البوادئ Primer efficiency(%) بتقسيم عدد الحزم احادية الشكل على العدد الكلي للحزم احادية الشكل مضروباً في 100، كما حسبت قوة الفعالية التميزية Discriminatory (%) power لكل توافق بتقسيم عدد الحزم المتعددة الأشكال على العدد الكلي للحزم المتعددة لجميع التوافقات مضروباً في 100.

النتائج والمناقشة

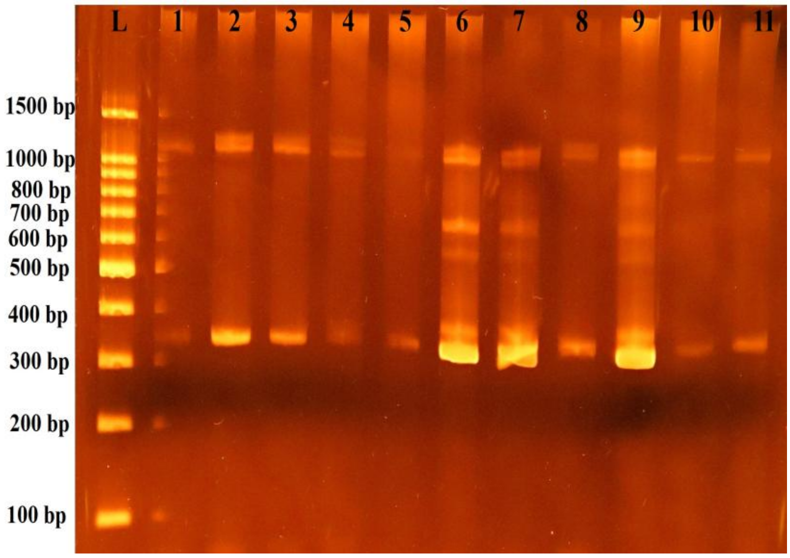
التضخيم العشوائي للدنا باستعمال تقانة SSR-PCR في ثمار الفلفل الحلو

درس التباين الوراثي بالأعتماد على تقانة SSR-PCR وباستعمال ستة بوادئ في جميع العينات. انتجت البوادئ الستة 33 حزمة في جميع العينات انتج منها البادئ الأول EPMS-342 سبع حزم في عينات الفلفل المدروسة وبعدد اربع حزم احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة و3 حزم متعددة الأشكال Polymorphic

وبنسبة مئوية 42.86% وكان كفاءة التوافق 44.45% مع قوة فعالية تميزية bands بنسبة 12.5% (شكل 1 أ،ب وجدول 3). انتج البادئ الثاني EPMS-397 اربع حزم في كل عينة كانت جميعها متباينة الشكل وكانت النسبة المئوية لهذه الحزم 100% ولم تظهر أي حزمة احادية الشكل وكان كفاءة التوافق 0% مع قوة فعالية تمييزية بنسبة 16.7% (شكل 2 أ، ب وجدول 3). انتج البادئ الثالث EPMS-426 سبع حزم في عينات الفلفل المدروسة وبعدد حزمتين احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة و5 حزم متعددة الأشكال Polymorphic bands وبنسبة مئوية 71.43% وكان كفاءة التوافق 22.22% مع قوة فعالية تمييزية بنسبة 20.8% (شكل 3 أ،ب وجدول 3)، بينما انتج البادئ الرابع EPMS-501 ست حزم في عينات الفلفل المدروسة وبعدد ثلاثة احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة و3 حزم متعددة الأشكال Polymorphic bands، وبنسبة مئوية 50% وكان كفاءة التوافق 33.33% مع قوة فعالية تمييزية بنسبة 12.5% (شكل 4 أ،ب وجدول 3)، كما انتج البادئ الخامس GPMS-290 اربع حزم في عينات الفلفل المدروسة كانت جميعها متباينة الشكل وكانت النسبة المئوية لهذه الحزم 100% ولم تظهر اي حزمة احادية الشكل وكان كفاءة التوافق 0% مع قوة فعالية تمييزية بنسبة 16.7% (شكل 5 أ،ب وجدول 3). انتج البادئ السادسGPMS-161 خمس حزم في عينات الفلفل المدروسة كانت جميعها متباينة الشكل وكانت النسبة المئوية لهذه الحزم 100% ولم تظهر أي حزمة احادية الشكل وكان كفاءة التوافق 0% مع قوة فعالية تمييزية بنسبة 20.8% (شكل 6 أ،ب وجدول 3)، علماً بأنه قد كان عدد الحزم الكلية الناتجة في جميع عينات الفلفل ذات حجم جزيئي يتراوح بين 100 زوج قاعدة واكثر من 1500 زوج قاعدة.

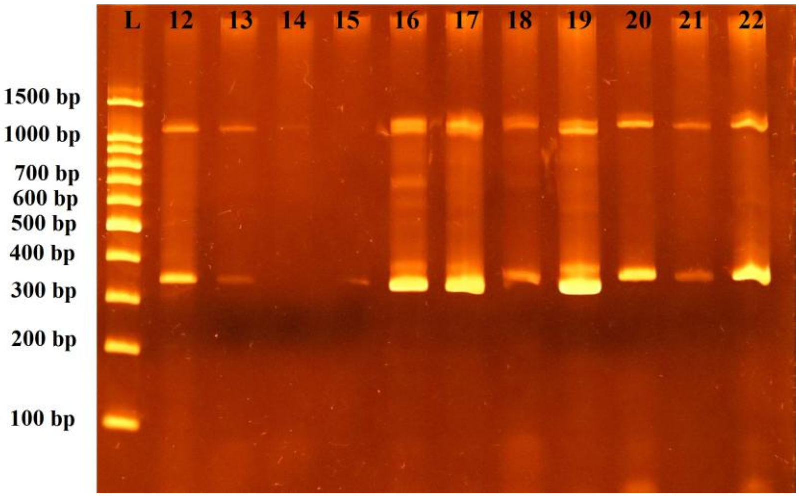
جدول (3): القطع المضخمة بتقانة SSR-PCR باستعمال ستة بوادئ في عينات الفلفل الحلو

البوادئ	عدد الحزم الأحادية الشكل	عدد الحزم المتعددة الأشكال	النسبة المئوية للحزم المتعددة الأشكال (%)	كفاءة التوافق بين البوادئ (%)	قوة الفعالية التمييزية (%)
البادئ الأول EPMS-342	4	3	%42.86	%44.45	%12.5
البادئ الثاني EPMS-397	0	4	%100	%0	%16.7
البادئ الثالث EPMS-426	2	5	%71.43	%22.22	%20.8
البادئ الرابع EPMS-501	3	3	%50	%33.33	%12.5
البادئ الخامس GPMS-29	0	4	%100	%0	%16.7
البادئ السادس GPMS-161	0	5	%100	%0	%20.8
المجموع	9	24	–	%100	%100



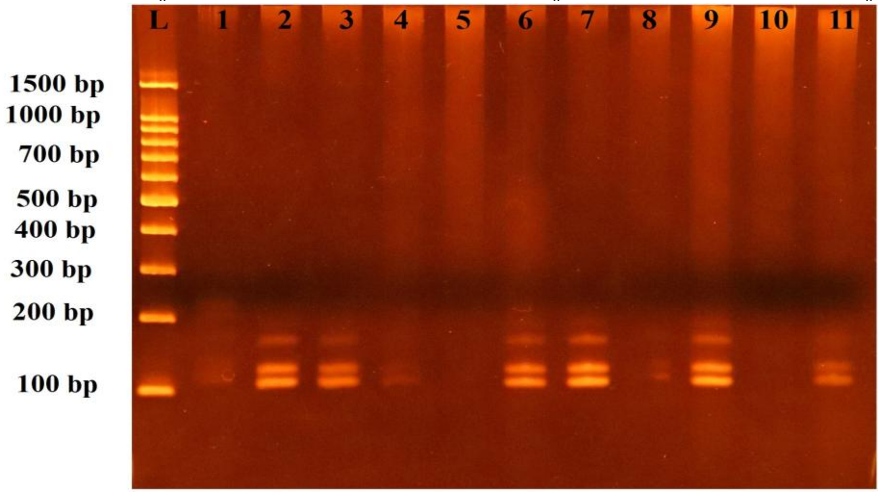
شكل (1أ): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-342 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني أحمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



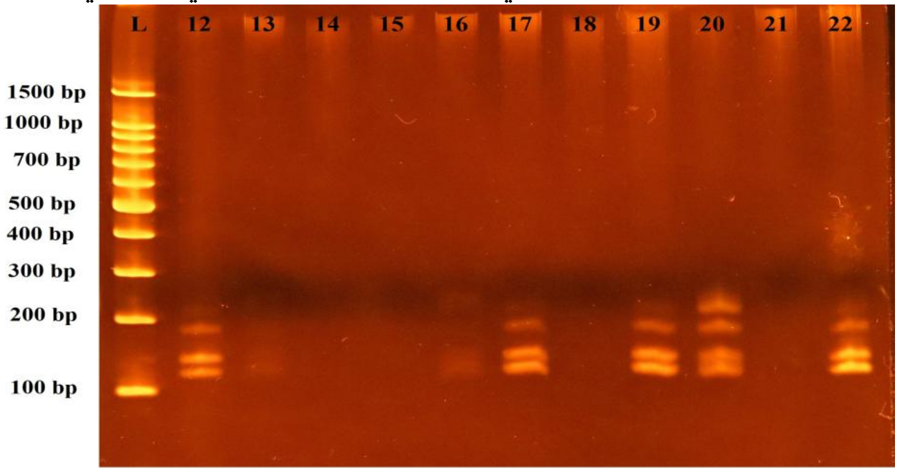
شكل (1ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-342 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



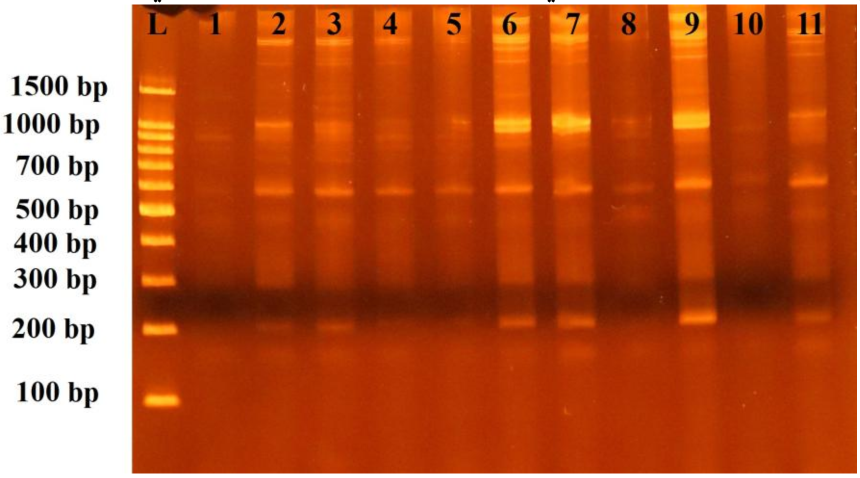
شكل (2أ): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-397 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني أحمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



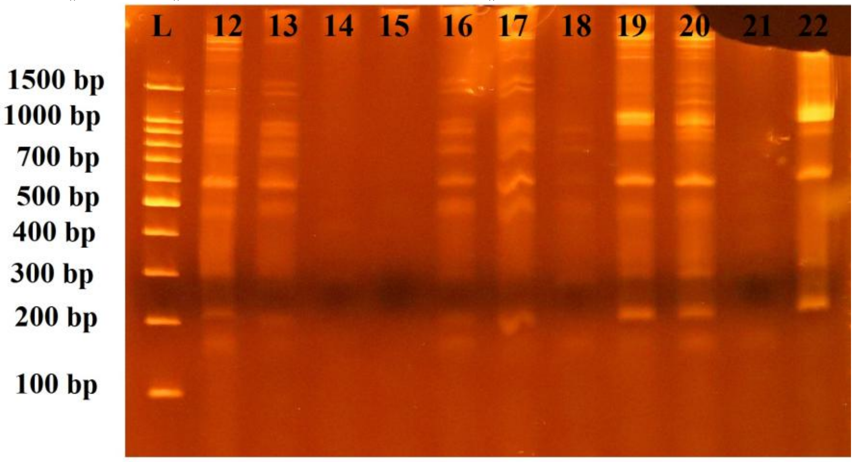
شكل (2ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-397 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



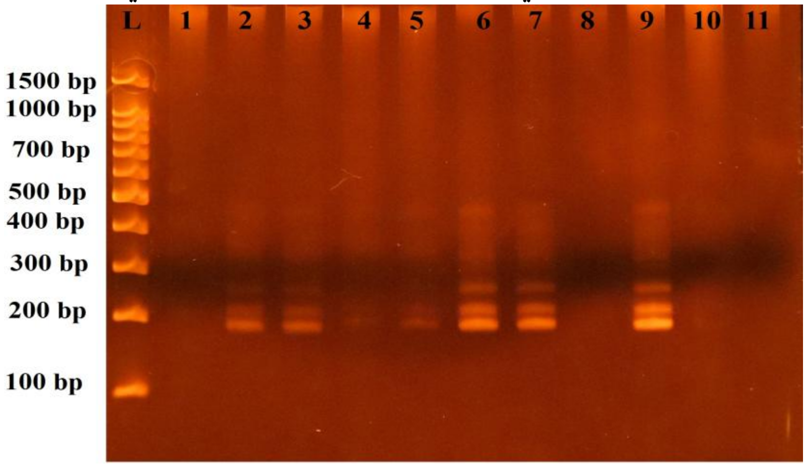
شكل (3أ): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-426 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني احمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



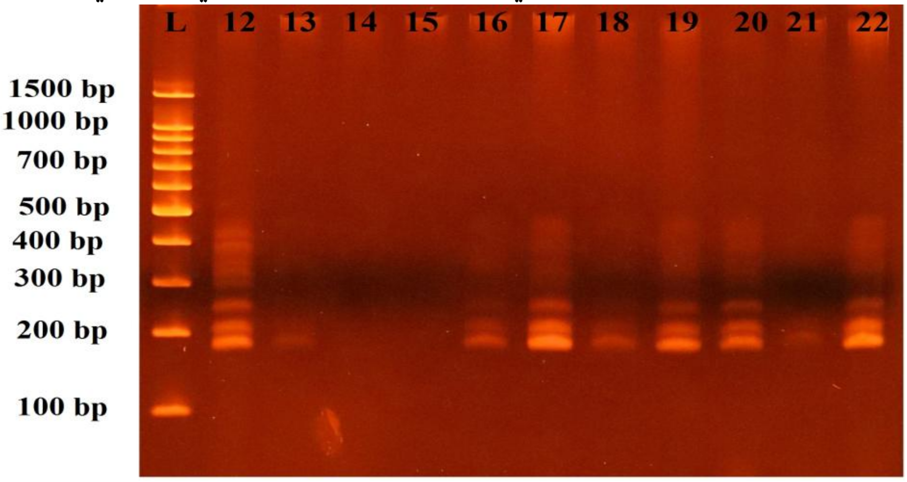
شكل (3ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-426 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



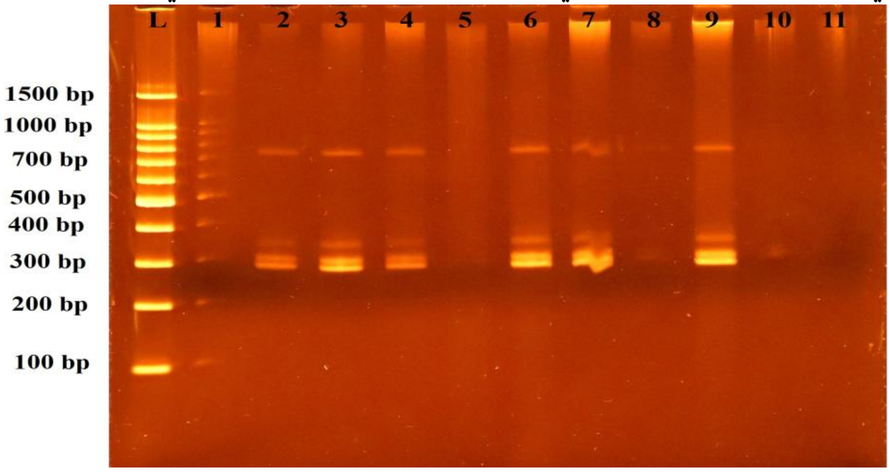
شكل (4أ): الترحيل الكهربائي لهلام متعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-501 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني احمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



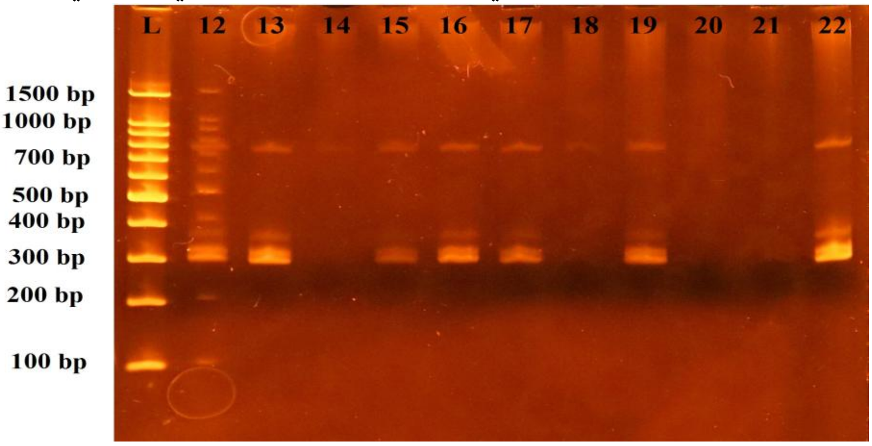
شكل (4ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-501 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



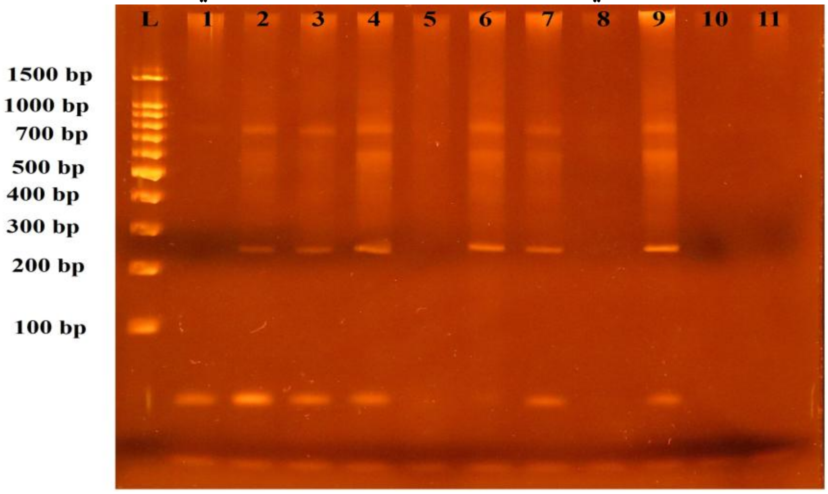
شكل (5أ): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ GPMS-29 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني احمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



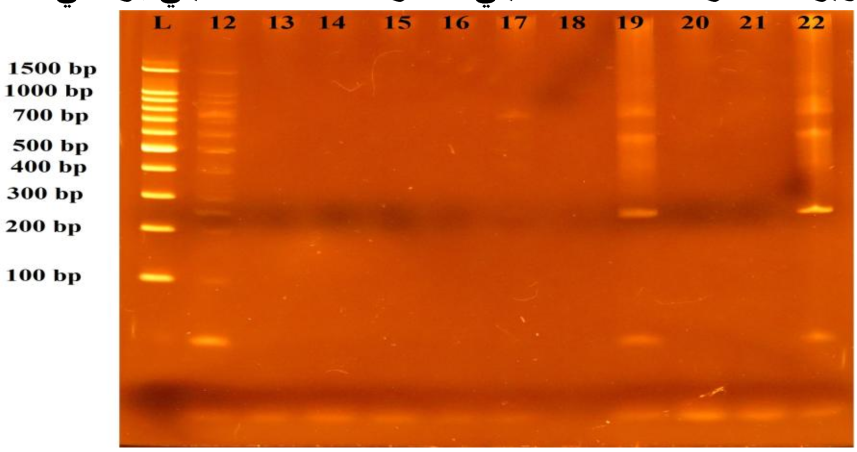
شكل (5ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ GPMS-29 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني صفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



شكل (6أ): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ GPMS-161 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني احمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



شكل (6ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ GPMS-161 وتقانة SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.

وجد الأمر نفس في دراسة Nagy *et al.* (2007)، اذ سجل البادئ Epms-342 اربع حزم متعددة الشكل وثلاث حزم للبادئ Epms-397 واربع حزم متعددة للبادئ Epms-426 وكذلك للبوادئ Gpms-29 وEpms-501 وخمس حزم للبادئ Gpms161، اما في دراسة Nicolaì *et al.* (2013) فقد سجل البادئ Epms397 22 اليلاً والبادئ Epms 426 15 اليلاً والبادئ Epms342 17 اليلاً والبادئ Gpms161 22 اليلاً والبادئ Gpms29 11 اليلاً وهذا ايضاً مخالف لعدد الأليلات الناتجة في الدراسة الحالية وقد يرجع السبب الى اختلاف طرائق الكشف عن ناتج تضخيم هذه البوادئ، اذ قد يعود السبب الى اختلاف الأنماط الجينية للفلفل المستعملة في الدراسات المذكورة. قدر تغاير واصمات SSR لنموات من الفلفل المزروعة في معهد Crop research Institute, Prague-Ruzyne, Department of vegetables and special crops in Olomouc وباستعمال ثمانية واصمات لـــ 41 نمواً Accession من الفلفل الأحمر واظهرت النتائج طيفاً موحداً Uniform spectra (اليل واحد فقط) في جميع النموات المدروسة عند استعمال ثلاثة من هذه الواصمات Hpms 1-168، Hpms 1-1 وHpms 1-274، اما الخمسة الباقية فتراوح عدد الأليلات من 2-8 اليلات وبمجموع 28 اليلاً تم تقصيه وبمعدل 3.5 اليل في كل موقع. بينت الخارطة الوراثية المبنية على نتائج هذه الدراسة تشابها عالياً بين بعض النموات التي كان من المفترض انها متباعدة (Hanáček *et al.*, 2009)، اما الباحثان Rodrigues and Tam (2010) فقد قاما باستعمال واصمات SSR في تشخيص ضروب من *Capsicum frutescens* والمزروعة في ماليزيا. استعملت عشر واصمات جزيئية متعددة الأشكال تم تطبيقها في تحديد مستويات التنوع الوراثي ضمن المجموعة قيد الدراسة، اذ لوحظ نقصان في النباتات ذات الزيجات المتباينة Heterozygotes ضمن المجموعة السكانية بأكملها، مما يشير الى ان معظم الضروب المزروعة في المنطقة مستمدة من التزاوج الداخلي Inbreeding فيما بينها وأن تقدير التغاير الوراثي الكلي لضرب من محصول مستزرع

ضمن منطقة جغرافية يمكن ان يعطي مؤشراً لمدى اعتماد المزارعين التقليديين على البذور من الضروب الطبيعية لأنتاج محاصيلهم، وقد بين Ince *et al.* (2010) عند استعمال 45 زوجاً من واصمات SSR لعدة انواع من الفلفل وعدة اجناس من العائلة الباذنجانية مثل الطماطا، البطاطا، الباذنجان والتبغ وان ازواج الواصمات قد ضخمت مجين كل من: *Capsicum annuum* L.، *C. chacoense*، *C. baccatum* L.، *C. chinense* L.، *C. grutescens* L. و *C. pebescens*، مما يشير الى امكانية استعمال هذه الواصمات مع جنس *Capsicum* وهي ذات تكرارات ثنائية الينوكليوتيدات، بينما التعدد الشكلي الأكثر على مستوى ضمن النوع Intraspecific يكون بتكرارات ثلاثية النيوكليوتيدات، اما الباحث Oh *et al.* (2012) فقد حدد واصمات SSR التي يمكن ان تستعمل بسرعة ودقة في تقييم وتحديد التغاير الوراثي وحفظ مصادر المادة الوراثية للفلفل البلغاري وقد استعملوا 22 واصماً من SSR مع 61 نمواً Accessions، وقد اظهرت النتائج 82 قطعة مضخمة ذات تعدد شكلي ومستوى واطئ نسبياً من التنوع الوراثي بين نموات الفلفل. وبدراسة التنوع والتشخيص الجزيئي للـــ Chili pepper باستعمال واصمات SSR فقد درست على 64 نباتاً معظمها من اصل هندي، وأظهرت النتائج 27 بادئاً من اصل 55 متعددة الأشكال وبمجموع 75 اليل وبمعدل 2.78 اليل في كل موقع والخارطة العنقودية قد اظهرت تسعة تجمعات منفردة بعضها عن بعض (Dhaliwal *et al.*, 2014)، واصمات SSR في دراسة هؤلاء الباحثين لم تتمكن من التفريق بين نموي Pls2 من PAUSel long و Tabasco عن Pepsi 8-1 وقد عزى الباحثون هذه الحالة الى ان التكرارات في المادة الوراثية هي نفسها لكن تحت مسميات مختلفة او ان الواصمات المستعملة غير كافية لتقصي الفروقات بين هذين الزوجين من الأنماط الوراثية او لمحدودية التقانة المستعملة Technological limitations، اما Rai *et al.* (2013) فقد اوضح نسبة التعدد الشكلي الواطئ لواصمات SSR في المادة الوراثية للفلفل بعد استعماله لاكثر من 102 واصماً كان 25 منها فقط ذا تعدد شكلي بعد فحصه لستة انماط وراثية للفلفل. ان اختلاف عدد الأليلات الناتجة من تضخيم بادئات SSR المتشابهة بين باحث وآخر ظهر عند (Minamiyama *et al.*, 2006)، اذ كان عدد الأيلات الناتجة من البادئ Cams163 هي تسعة اليلات ومن البادئ Cams647 هو عشرة اليلات، بينما

في دراسة (Hanáček *et al*., 2009) سجل البادئ Cams163 اليلين فقط والبادئ Cams647 ستة اليلات.

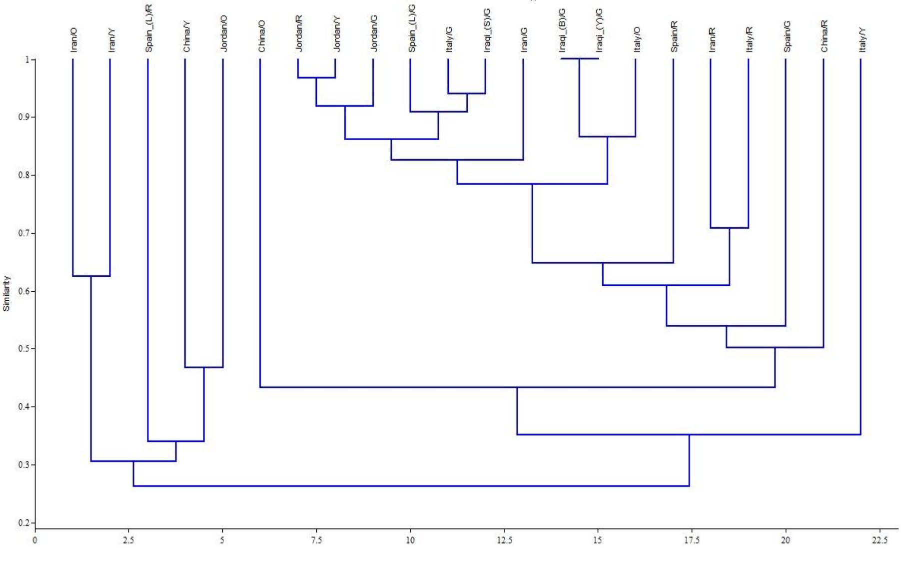
مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) لثمار الفلفل الحلو بالأعتماد على نتائج تقانة SSR-PCR

رسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على النتائج المتحصلة من البادئات العشوائية وباستعمال تقانة SSR-PCR على عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة وباستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي. يتضح من الشكل (7) بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي في عشر مجاميع رئيسة. المجموعة الأولى ضمت ثمار الفلفل الحلو الأيراني البرتقالي والأصفر والمجموعة الثانية ضمت ثمار الفلفل الحلو الأسباني الطويل الأخضر، اما المجموعة الثالثة فضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني الأصفر والفلفل الأردني البرتقالي والمجموعة الرابعة ضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني البرتقالي، بينما المجموعة الخامسة ضمت ثمار الفلفل الحلو الأيطالي الأصفر. المجموعة السادسة ضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني الأحمر، بينما ضمت المجموعة السابعة ثمار الفلفل الأسباني الأخضر، اما المجموعة الثامنة فضمت عينتي الفلفل الحلو الأيطالي الأحمر والأيراني الأحمر. المجموعة التاسعة فضمت الفلفل الحلو الأسباني الأحمر، اما المجموعة العاشرة والأخيرة فتكونت من اثنين من تحت المجموعة. ضمت تحت المجموعة الأولى ثمار الفلفل الحلو الأيطالي البرتقالي والفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية، بينما ضمت تحت المجموعة الثانية ثمار الفلفل الحلو الأيراني الأخضر والعراقي/صويرة، الأيطالي الأخضر، الأسباني الطويل الأخضر، والأردني الأخضر والأصفر والأحمر. لقد اوضح هذا المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية الأخضر وبنسبة 1 وهي اعلى قيمة تشابه بالمقارنة مع اقل تشابه لعينة الفلفل الأسباني الطويل الأخضر وبقيمة 0.35. نسبة التشابه العالية قد ظهرت ايضاً بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأصفر والأحمر وبقيمة 0.98 وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/صويرة الأخضر وثمار الفلفل الحلو الأيطالي الأخضر وبقيمة 0.94. ثمار الفلفل الحلو الأيطالي البرتقالي والعراقي/بلد واليوسفية الأخضر (يقعان في نفس تحت المجموعة) اظهرا تشابهاً وبقيمة 0.88. ثمار الفلفل الحلو الأيطالي الأحمر والأيراني الأحمر قد اظهرا تشابهاً بقيمة

0.72. المجاميع الرئيسة الثلاثة الأولى قد اظهرت تشابهاً بعيداً عن بقية العينات الأخرى وبقيمة 0.26.

في دراسة اجريت لغرض تحديد وتقييم فعالية واصمات SSRS في تشخيص ضروب الفلفل وذلك بمقارنتها مع الصفات المظهرية في اختبار التميز، الأنتظام والأستقرارية Distinctiveness, Uniformity, stability (DUS) فقد استعمل 27 واصماً من SSR وكانت جميعها ذات تعدد شكلي Polymorphic في دراسة 66 ضرباً من ضروب الفلفل، اذ انتجت هذه الواصمات 89 اليلاً، وباستعمال بالتحليل العنقودي Cluster analysis فقد فصلت الضروب الى ثلاث مجاميع رئيسة، ولقد لوحظ عدم وجود علاقة معنوية بين المعلومات المظهرية ومعلومات SSR (Kwon *et al.*, 2005)، كما قدم Nagy *et al.* (2007) مجموعة جديدة من واصمات SSR في الفلفل *Capsicum annuum*، اذ مسح 168000 نسخة من نسخ الجين Genomic clones و23174 قاعدة بيانات عامة Public database والتي يمكن استعمالها في تصميم البادئ وعند اختبرت عملياً نتج عنها 411 تسلسلاً تتابعياً Microsatellite containing sequences، كان منها 154 واصم SSR من المكتبات الجينية و257 واصماً من تسلسلات قاعدة البيانات، كذلك كان هناك 147 واصماً (61 واصماً من المكتبات الجينية و86 واصماً من تسلسلات قاعدة البيانات) قد سجلت تعدداً شكلياً بين 2– 33 خطاً من خطوط الفلفل البري والمدجن، وقد ظهرت فائدة هذه الواصمات الجديدة من خلال رسم شجرة القرابة التي بنيت استناداً الى التعدد الشكلي للتوابع Microsatellite، وتبين امكانية استعمال هذه الواصمات مع انواع اخرى من العائلة الباذنجانية Solanaceae. كما بين الباحث نفسه بأن شجرة القرابة المبنية على ان ثمار الفلفل الصغيرة والمستوردة من خارج هنكاريا قد وضعت في مجموعة منفصلة عن الأصناف المدجنة ذات الثمار الكبيرة، كذلك انفصلت انماط الفلفل الأحمر البارد الهناكاري (البابريكا) عن الخطوط التجارية للفلفل، بينما (Sonnante and Pignone, 2007) اشارا الى ان الأقتران مابين التشابه الوراثي والبعد الجغرافي للمزروعات الأصلية ليس واضحاً بصورة دائمية، اما Tam *et al.* (2009) فقد بينوا الأساس الوراثي الضيق للفلفل الحلو الكبير مقارنة مع النباتات الأصلية الخارجية Exotic landraces عند دراسة 64 نمواً من الفلفل باستعمال واصم SSAP وعزى وجود التشابه الوراثي رغم اختلاف البلد الى الهجرة المتعددة لأنماط الفلفل عن طريق المزارعين وتبني البلدان الجديدة لهذه الأنماط ومن ثم الأنتخاب

المحلي الإضافي لها بعد استقرارها في المنطقة. لأجل تحديد التغاير في جنس الفلفل عموماً ولأختيار المجموعات المشتركة Co-collections وتوسيع التنوع الوراثي والمظهري، فقد فحصت مجموعة من احد عشر نوعاً من الفلفل عائدة لـــ 89 بلداً مختلفاً، وباستعمال 28 واصماً من SSR فقد تبين ظهور ستة مجاميع عنقودية Clusters، ثلاث منها تفضل النوع الرئيس بضمنها النوع المدجن والأقارب البرية بحسب التصنيف Taxonomic classification، وثلاث مجاميع اضافية للفلفل *Capsicum annuum*، كما وحددت العلاقة بين انواع الفلفل المستزرعة والنوع البري للجنس *C. annuum* var. *glabriusculum* (Nicolaì *et al*., 2013)، اما الباحث Rai *et al*. (2013) فاستعمل واصمات SSR باستعمال تقانة Random amplified microsatellite polymorphism (RAMPO) في تحليل التنوع الوراثي والعلاقات بين 48 نمطاً من نبات الفلفل *Capsicum* spp. ومن تسعة بلدان مختلفة. استعمل 106 واصماً كان 25 منها فقط ذا تعدد شكلي وبمجموع 76 اليل و17 واصماً باستعمال تقانة RAMPO قد انتجت 87 قطعة متعددة الأشكال ساعدت في بناء خرائط القرابة المبنية على معلومات كلا الواصمين. بينت النتائج ظهور مجموعتين اساسية لجميع الأنماط *C. annuum* الثمانية والثلاثين، بينما كانت الأجناس *C. baccatum*، *C. frutescens* و *C. chinense* قد ظهرت في تجمع آخر. ان التغاير ضمن الأنماط التي لاتنتمي الى نوع non annuum كان اكبر من التغاير في جنس *C. annuum* L..



شكل (7): شجرة القرابة الوراثية Dendrogram اعتماداً على نتائج تقانة SSR-PCR لعينات ثمار الفلفل المدروسة بحسب معامل Jaccard للتشابه الوراثي

قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو بالأعتماد على نتائج تقانة SSR-PCR

قدر البعد الوراثي بين عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة باستعمال البرنامج الأحصائي Past اعتماداً على نسبة التشابه باستعمال معامل احصائي هو Euclidean coefficient وكما في الجدول (4). اظهرت النتائج بأن اعلى قيمة بعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد الأخضر والفلفل العراقي/يوسفية الأخضر وعينة الفلفل الأيراني البرتقالي وبقيمة 5.656، بينما كان اقل بعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو الأردني الأخضر والأردني الأصفر، اذ كانت القيمة مساوية الى 1.0. بقية عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة فقد تراوحت قيم ابعادها الوراثية بين 1.0 و5.656.

ان الآف السنين من الأنتخاب الصناعي في البيئات المختلفة قد ادى الى ظهور طفرات جديدة وتوافقات البلية Allele combination ذات اهمية زراعية (Nicolaì *et al*., 2013). التغاير الجيني بين انماط الفلفل *C. annuum* يكون قليلاً في الأنماط البرية وشبه البرية وهذا متوقع لأنه خلال عملية التدجين كل انواع المحاصيل تقريباً تعاني انخفاضاً في التنوع الجيني (Gepts, 2004 ; Oyama *et al*., 2006)، كما ان سبب صعوبة التفريق بين الأصناف التجارية المهجنة من الفلفل Commercial pepper varieties يعود الى تنوعها الجيني الواطئ الناتج عن التعدد الشكلي الجزيئي المنخفض (Lefebvre *et al*., 2001 ; Kwon *et al*., 2005)، ان الأنتخاب المستمر لخطوط التربية ذات الصفات المرغوبة تجارياً ادت الى تضييق التنوع الوراثي في العديد من انواع المحاصيل (Ince *et al*., 2009) وهذا ما اكده Ortiz *et al*. (2010) عندما بينوا ان التغاير في ثمار الفلفل الحلو اضيق من التغاير في ثمار الفلفل الحار Chili وأن معظم الأنواع المدجنة فقدت تغايرها الجيني عند بدء عملية التدجين ومما زاد الأمر سوءاً هجرة هذه الأنواع من مواقعها الأصلية الى مواقع اخرى مختلفة (Tang *et al*., 2010). في دراسة لأنواع الفلفل المكسيكي البري والمدجن كانت النتائج تشير الى تغاير وراثي عال بين وضمن *C. annuum* على عكس الدراسات السابقة في المكسيك التي اجريت على عينات ماخوذة من بنك المادة الوراثية Germplasm bank وظهر انخفاض طفيف للفلفل المدجن المأخوذ من سبعة مواقع مختلفة وقد عزى الباحثون هذا الأختلاف الى اثر التدجين على التغاير الجيني للمجاميع المدجنة مقارنة مع التجمعات البرية (Pacheco-Olvera *et al*., 2012).

Samples	Jordan/O	Jordan/R	Jordan/Y	Jordan/G	Spain/G	Iraqi (B)/G	Iraqi (Y)/G	China/R	Iraqi (S)/G	China/Y	China/O	Spain (L)/G	Iran/R	Iran/O	Iran/Y	Italy/R	Italy/O	Italy/Y	Italy/G	Spain/R	Spain	
Jor	0																					
Jor	3	0																				
Jor	4	1	0																			
Jor	3	1	1	0																		
Sp	3	3	3	3	0																	
Ira	4	2	2	3	4	0																
Ira	4	2	2	3	4	0	0															
Ch	3	4	4	3	3	4	4	0														
Ira	4	1	1	2	3	2	2	4	0													
Ch	2	4	4	4	3	5	5	3	5	0												
Ch	3	4	4	4	3	4	4	3	4	2	0											
Sp	4	2	2	2	3	2	2	4	1	5	4	0										
Ira	3	3	3	3	3	4	4	3	3	3	3	3	0									
Ira	3	5	5	4	4	5	5	4	5	2	3	5	3	0								
Ira	3	4	4	4	4	5	5	3	5	3	4	4	3	1	0							
Ital	3	3	3	3	3	4	4	4	3	4	4	3	2	4	3	0						
Ital	4	3	3	3	4	2	2	3	3	5	4	2	3	5	4	3	0					
Ital	4	4	4	4	4	4	4	3	5	3	4	5	3	3	3	4	4	0				
Ital	4	1	2	2	3	2	2	4	1	5	4	1	3	5	4	3	3	4	0			
Sp	5	4	3	4	3	3	3	3	3	4	3	3	4	5	5	3	2	4	3	0		
Sp	3	4	5	4	3	5	5	4	5	2	3	4	3	2	2	3	5	3	5	4	0	
Ira	3	2	2	2	3	3	3	4	2	4	4	2	3	4	4	2	3	4	2	4	4	0

جدول (4): قيم الأبعاد الوراثية لعينات الفلفل المستوردة باعتماد نتائج **SSR-PCR**

اعلى قيمة بعد وراثي	
اقل قيمة بعد وراثي	

المصادر

1. Oh, S-J., Song, J-Y., Lee, J., Lee,G-A Ko, H-C., T. Stoilova, T., Krasteva, L. Kim, Y-G., Rhee, J-H., Gwag, J-G., Ro, N-Y., On-Sook Hur, O-S. and Myung-Chul Lee, M-C. (2012). Evaluation of Genetic Diversity of Red Pepper Landraces (*Capsicum annuum* L.) from Bulgaria Using SSR Markers. Korean J. Int. Agri. 24(5):547-556.
2. Dhaliwal, M. S. ;Yadav, A. and Jindal, S. K. (2014). Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence vepeats (SSR) markers. Afr. J. Biotechnol. 13(31):3137-3143.
3. Geleta, L. F.; Labuschagne M. T. and Viljoen C. D. (2005). Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. Biodivers Conserv 14, 2361-2375. doi:10.1007/s10531-004-1669-9.
4. FAO. (2010). The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture.Rome370p. http://www.Fao.org.

5. Nicolaì, M ; Cantet, M. ; Lefebvre, V. ; Sagepalloix, A. M. and Palloix, A. (2013). Genotyping a large collection of pepper (C*apsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. Genet . Resour. Crop. Evol. 60:2375-2390.
6. Tanksley, S. D. and Mc Couch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science. 277:1063-1066.
7. Lanteri, S.and Barcaccia, G. (2006).Molecular marker based analysis for crop germplasm preservation. In : Ruane, J. ; sonnino, A. (Ed.).the role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources .Rome: FAO. 55-66.
8. Kochieva, E. Z. and Ryzhova, N.N. (2003). Molecular AFLP analysis of the genotypes of pepper *Capsicum annuum* cultivars. Russian J. Genet. 39(12):1345-1348.
9. Zhang, L. ; Li, H. ; Wang, H. and Li, L. (2007). Genetic diversification of the Chinese wheat landrace Mazhamai as revealed by morphological characteristics, seed storage proteins and micro satellite markers. Can. J. Plant Sci. 87:763-771.
10. Hayden, M. J., Tabone, T. L., Nguyen, T. M., Coventry, S., Keiper, F.J., Fox, R. L., Chalmers, K. J., Mather, D. E. and Eglinton J. A. (2010). An informative set of SNP markers for molecular characterization of Australian barley germplasm. Crop Plant Sci. 61:70-83.
11. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijanas, M.; de Lee, T. V.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23(21):4407-4414.
12. Paran, I.; Aftergoot, E. and Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. Euphytica 99:167-173.
13. Toquica, S. P.; Rodriquez, F.; Martinez, E.; Duque, M. C. and Tohme, J. (2003). Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon department in Columbia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. Genet Res Crop Evol. 50:639-647.
14. Prince, J. P.; Loiaza, F. and Tanksley, S. D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among mexican accessions of *Capsicum*. Genome 35: 726-732.
15. Prince, J. P.; Lackney, V. K.; Angeles, C.; Blauth, J. R. and Kyle, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome 38:224-231.
16. Hanáček, P.; Vyhnánek, T.; Rohrer, M.; Cieslarova, J. and Stavělíkova, H. (2009). DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. Hort Sci. (PRAGUE). 36: 127-132.

17. Sitthiwong, K.;Matsui,T.; Sukprakarn, S.; Okuda, N. and Kosugi, Y. (2005). Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions by RAPD analysis. Biotechnology. 4(4):305-309.
18. Thul, S. T.; Darokar, M. P.; Shaseny, A. K. and Khanuja, S. P. S. (2011). Molecular profiling of genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. Mol. Biotechnol. 51(2):137-147.
19. Varshney, R. K. ; Graner , A. and Sorrels, M. E. (2005). Genetic micro satellite markers: their characteristics, development and application to plant breeding and genetics Trends. Biotech. 23:48-55.
20. Turnpenny, P. and Ellard, S. (2005). Emery's elements of medical Genetics.12th.ed Elsevier, London.
21. Litt, M. and Luty, J. A. (1989). Ahypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44:397-401.
22. Jacob, H. J. ; Lindpaintner, K. ; Lincolin, S. E. ; Kusumi, K. ; Bunker, R. K. ; Mao, Y. P. ; Ganten, D. ; DZau, V. J. and Lander, E. S .(1991).Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. Cell.67:213-224.
23. Edwards, A. ; Civitello, A. ; Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am. J. Hum. Genet.49:746-756.
24. Powell, W. ; Morgante, M. ; Andre, C. ; Hanafey, M. ; Vogel, J. ; Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFIP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis.Mol. Breed. 3:225-238.
25. Weising, K. ; Nybom, H. ; Wolf, K. and Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants . Principles, methods and applications. 2nd Edition, CRC press.
26. Soni, K. ; Rawat, S ; Gupta, A. ; Yangzom, K. ; Pan dit, S. ; Naik P. K. and Singh, H. (2010).Genetic characterization of *Rhodiola rosea* using gene specific SSR and CAPS molecular markers. Genetic Engineering and Biotechnol. J. 11:1-10.
27. Tam, S. M. ; Mhiri, C. ; Vogelaar, A. ; Kerkveld, M. ; Pearce, S. R. and Grand bastien, M. A. (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by ret transposn- based SSAP,AFLP and SSR. Theor .Appl. Genet.110:819-831.
28. Oue , t. ; Minamiyama , Y .and Kubo, N. (2012) . An SSR-based genetic map of pepper (C*apsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. Breeding Sci.62:93-98.

29. Lee, J. M., Nahm, S. H., Kim, Y. M. and Kim, B. D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. Theor. Appl. Genet. 108: 619-627.
30. Rodrigues, J. M.; Berke, T.; Engle, L. and Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. Theoretical and Appl. Genet. 99:147-156.
31. Ince, A. G.; Karaca, M. and Onus, A. N. (2010). Genetic relationships within and between *Capsicum* species. Biochem. Genet. 48:83-95.
32. Kwon, Y. S., Lee, J. M., Yi, G. B., Yi, S. I., Kim, K. M., Soh, E. H., Bae, K. M., Park, K. M., Song, I. H. and. Kim, B. D. (2005). Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Mol. Cells. 19(3):1-8.
33. Minamiyama, Y., Tsuro, M. and Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. Mol. Breed. 18: 157-169.
34. Nagy, I., Stágel, A., Sasvári, Z., Röder, M.and Ganal, M. (2007). Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). Genome. 50:668-688.
35. Nicolaì, M., Pisani, C., Boucher, J.-P., Vuylsteke, M. and Palloix, A. (2012). Discovery of a large set of SNP and SSR genetic markers by high-throughput sequencing of pepper (*Capsicum annuum*). Genet. Mol. Res. 11(3):2295-2300.
36. Becher, S. A., Steinmetz, K., Weising, K., Boury, S. and Peltier, D. (2000). Microsatellites for cultivar identification in Pelargonium. Theor. Appl. Genet. 101: 643-651.
37. Kang, T. J. and Yang, M. S. (2004). Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic. BMC Biotechnology. 4(20):1-12.
38. Hammer, Ø.; Harper, D. A.T. and Ryan, P. D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Eletronica. 4(1):1-9.
39. Rodrigues, K. F. and Tam, H. K. (2010). Molecular markers for C*apsicum frutescens* varieties cultivated in Borneo. J. Plant Breeding and crop Sci. 2(6):165-167.
40. Rai, V. P. ; Kumar, R. ; Kumar, S. ; Rai, A. ; Kumar, S. ; Singh, M. ; Singh, S. P. ; Rai, A. B. and Paliwal, R. (2013).Genetic diversity in *Capsicum* germplasm based on micro satellite and random amplified micro satellite polymorphism markers . Physiol. Mol. Biol. Plants. 19(4):575-586.
41. Sonnante, G. and Pignone, D. (2007). The major Italian land races of lentil (*Lens culinaris* Medik.) their molecular diversity and possible origin. Genet. Resour. Crop Evol. 54:1023-1031.

42. Tam, H., Lefebvre, V., Palloix, A., Sage-palloix, A. M. and Grand Bastien, M. A. (2009). LTR-retrotransposons Tnt1 and T135markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. Theor. Appl. Genet. 119:973-989.
43. Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. Plant Breed Rev. 24:1-44.
44. Oyama, K., Verdugo, S. H., Sanchez, C., Rodriguez, A. G., Pena, P. S., Tiznado, J. A. and Casas, A. (2006). Genetic structure of wild and domestic cated populations of *capsicum annuum* (solanaceae) from north western Mexico analyzed by RAPDS . Genet. Resour. Crop Evol. 53:553-562.
45. Lefebvre, V., Goffinet, B., Chauvet, J. C., Caromel, B., Signoret, P., Brand, R. and Palloix, A. (2001). Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data.Thero Appl.Genet.102:741-750.
46. Ince, A. G., Karaca, M. and Onus, A. N. (2009). Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *capsicum* accessions. Genet. Resour. Crop. 6:211-221.
47. Ortiz, R. F., Dela Flor, D., Alvarado, G.and Crossa, J. (2010). Classifying vegetable genetic resources-Acase study with domesticated *capsicum* spp. Sci. Hortic.126:186-191.
48. Tang, H., Sezen, U. and Paterson, A. H. (2010). Domestication and plant genome. Curr. Opin. Plant Biol.13:160-166.
49. Pacheco-olvera, A., Hernandez-verdugo, S., Rocha-Ramirez, V., Gonzalez-Rodriguez, A. and Oyama, K. (2012). Genetic diversity and structure of pepper (*capsicum annuum* L.) from north western Mexico analyzed by micro satellite markers. Crop Sci. 52:231-241.

SSR-PCR technique for detecting the genetic diversity of *Capsicum annuum* L. in local and imported samples in Iraq

Ihsan A. Hussein and Shaymaa S. Mahdi*
Department of Biology, College of Education for Pure Science - Ibn - Al-Haithim, University of Baghdad

Abstract

Genetic variation was studied in 22 local and imported samples collected from local Iraqi market by using Single sequence repeat (SSR-PCR). Six primers set were used in this study. These primers produced 33 bands. Molecular weights of these bands ranged between 100 bp to 1500 bp. The number of polymorphic bands is 24, whereas the number of monomorphic bands is 9. The results of Dendrogram of the studied samples depended on SSR-PCR results by using Jaccard coefficient for genetic similarity was distributed the samples into 10 groups. This Dendrogram revealed a higher similarity between Iraqi/Balad green bell pepper and Iraqi/Yousifia green bell pepper with 1 value. This value is the highest between samples in comparison with lowest values (0.35), which are found in Spanish long green. There are another high values were revealed between Jordanian yellow and red bell pepper with 0.98 value. Also, other high similarity values revealed between and Iraqi/ Souwyera green bell pepper and Italian green bell pepper with 0.94 values. Italian orange bell pepper and Iraqi/ Balad and Yousifia green bell pepper (the two samples in same subgroup) showed similarity with 0.88 values. The Italian and Iranian red bell pepper showed similarity with 0.72 values. The three main groups showed dissimilarity with 0.26 values. The genetic distance between studied samples by using Euclidean coefficient revealed the highest values between Iraqi/Balad and Yousifia green bell pepper with Iranian orange bell pepper with 5.656 values, in comparison with the lowest genetic distance between Jordanian green and yellow bell pepper with 1.0 value. The other samples showed genetic distance between 1 and 5.656.

Keywords: Genetic variation, *Capsicum annuum* L. , SSR, Bell pepper

* This work is a part of Ph.D thesis for the second researcher.