

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 - ابن الهيثم

الخلاصة

درس التباين الوراثي في 22 عينة محلية ومستوردة من ثمار الفلفل الحلو التي جمعت من الأسواق المحلية العراقية باعتماد تقانة تكرر التسلسل البسيط Single (SSR-PCR) sequence repeat. استعملت ستة بواقي في هذه الدراسة وأن هذه البواقي قد انتجت 33 حزمة كان جميعها ذات حجم جزيئي يتراوح بين 100 زوج قاعدة وأكثر 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 رئيسية. 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 وبقية 0.35. نسبة التشابه العالية قد ظهرت ايضاً بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأصفر والأحمر وبقية 0.98 وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/صويرة الأخضر وثمار الفلفل الحلو الإيطالي الأخضر وبقية 0.94. ثمار الفلفل الحلو الإيطالي البرتقالي والعراقي/بلد واليوسفية الأخضر (يقعان في نفس تحت المجموعة) اظهرا تشابهاً وبقية 0.88. ثمار الفلفل الحلو الإيطالي الأحمر والأيراني الأحمر قد اظهرا تشابهاً وبقية 0.72. المجاميع الرئيسية الثلاثة الأولى قد اظهرت تشابهاً بعيداً عن بقية العينات الأخرى وبقية 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 الإيراني 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 الجرسى

المقدمة

مقدار التنوع الوراثي للأنواع يعد أساساً لبقائه وتكيفه في مختلف البيئات، وأن تغاير المادة الوراثية للسلاسل 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 لسمح 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 (Nicolai et al., 2013)، وأن تضيق القاعدة الوراثية للأنواع البرية ظهر عند تحويلها إلى انواع مدجنة وكذلك عند استبدال السلاسل الأصلية بالمزروعات الحديثة Modern cultivars (Tanksley and Mc couch, 1997)، إذ ان هذه السلاسل 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 DNA markers جيدة لدراسة الفلفل لأن مجينه عالي الثبات 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 المظهرية Morphological characteristics، تحليلات علم الأنساب Analysis of genealogy، الواسمات الكيميائية الحيوية Biochemical markers وواسمات الدنا الجزيئية Molecular DNA markers. الواسمات 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 الواسمات الجزيئية في دراسة التنوع الوراثي في الفلفل مثل AFLP (Vose *et al.*, 2003) (Prince *et al.*, 1995 ; Paran *et al.*, 1998 ; Toquica *et al.*, 2003) RAPD و (Hanáček *et al.*, 2009) SSR ، *al.*, 1992 ; Prince *et al.*, 1995) (Sitthiwong *et al.*, 2005 ; Thul *et al.*, 2011). تعد تكرارات التسلسلات البسيطة SSR او التتابع Microsatellites من اكثر الواسمات الوراثية استعمالاً في تشخيص اختلافات وتنوع النباتات خصوصاً في الأنواع المدجنة Cultivated species ذات التعدد الشكلي القليل Low polymorphism وكذلك في تحديد خرائط الصفات الكمية Mapping quantitative traits وانتخاب الصفات المرغوبة بواسطة الواسمات 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 الواسمات مفيدة جداً في دراسات التحليلات الوراثية Genetic analysis للنباتات والحيوانات، وذلك لتغايرها وتنوعها العالي وسهولة تقصيدها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)، إذ انها ذات اشكال اليلية متعددة الأشكال Multi allelic forms، قابلة للتكرار Reproducible وذات سيادة مشتركة Co-dominant مقارنة بالواسمات 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 15(AT)، 15(GA)، 15(GT)، 10(ATT) و 10(TTG) 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 15(GT) و 15(GA) قد ظهرت بتعدد عال في جينات الفلفل تليها التكرارات 10(TTG) ثم 15(AT)، وبذلك فقد طور 36 واصماً من SSR، كما اظهرت الواصلات الموجودة في جنس الفلفل والمحفوظة في المكتبات الجينية محتوى عالياً من معلومات تعدد الأشكال Polymorphism information contents بمقدار مرتين اكثر من قيمة الواصلات الموجودة في بنك الجينات (Lee et al., 2004). ان استعمال الواصل الجزيئي تكرر 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 الواصلات 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 ; Nicolai et al., 2012 ; Oh et al., 2012) تكون هذه التقانة تعطي تبايناً عالياً، وكذلك تعطي تباينات للأليلات ذات السيادة المشتركة وللاليلات 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 يتسن لنا معرفة فيما إذا كانت العينات ضروب مستزرعة أو نباتات محورة وراثياً لعدم معرفة المصدر الحقيقي للبلاد المصدر لتلك الثمار (جدول 1).

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

محافظة بغداد

ت	نوع ومصدر إنتاج العينة	لون الثمرة
1	فلفل اردني	برتقالي
2	فلفل اردني	احمر
3	فلفل اردني	اصفر

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

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 و EDTA بتركيز 50 ملي مولر و NaCl بتركيز 500 ملي مولر و β -mercaptoethanol بتركيز 10 ملي مولر و ذي اس هيدروجيني مقداره 7.5.

محلول الأكريلاميد: المثيلينيس أكريلاميد الخزين Acrylamide: Methylenbisa crylamid (19:1)

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

هلام متعدد الأكريلاميد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation

حضر هذا الهلام بأذابة 45 غراماً من اليوريا Urea (7.5 مولر) في 10 ملتر من دارئ TBE بتركيز 10X و 15 ملترًا من المحلول الخزين Acrylamide: Methy lenbisacrylamid (19:1) الذي تركيزه 40% في حالة تحضير هلام بتركيز 6% واكمل الحجم إلى 100 ملتر بالماء المقطر. اضيف لكل 10 ملتر من هذا الهلام 50 مايكرولتر من المحلول الخزين Ammonium persulphate (APS) بتركيز 10% و 30 مايكروليتر من محلول Tetramethylethylene diamine (TEMED).

البوادئ المستعملة في تجارب SSR-PCR

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

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

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

ت	أسم البوائى	التسلسل النيوكليوتيدي البائى (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'-ATTGATTGCTTGCTCCTTG- 3'
5	GPMS29	F: 5'-CAGGCAATACGGAGCATC- 3' R: 5'-TGTGTTGCTTCTTGACGAC- 3'
6	GPMS161	F: 5'-CGAAATCCAATAAACGAGTGAAG- 3' R: 5'-CCTGTGTGAACAAGTTTTCAGG- 3'

معلومات الوزن الجزيئي للدنا

استعمل المعلم الجزيئي Molecular marker المصنع من قبل شركة Promega بحجم كلي 1500 زوج قاعدة و بدرجات 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 ملتر. سحقتم انسجة ثمار الفلفل الحلو في 100 مايكرو لتر من دارى استخلاص الدنا DNA extraction buffer باستعمال قضيب بلاستيكي لمدة من 15-20 ثانية. اضيف 300 مايكرو لتر اضافي من دارى استخلاص الدنا وسحقت ايضاً انسجة ثمار الفلفل لمدة من 15-20 ثانية وكما في اعلاه. اضيف 40 مايكرو لتر من محلول SDS بتركيز 20% وتم خلطه بالهزاز Vortex لمدة 30 ثانية. حضنت العينة تحت حرارة 65 °م لمدة 15 دقيقة لغرض تحليل الخلايا. اضيف 10 مايكرو لتر انزيم من DNase-free RNase A من المحلول الخزين 10 ملي غرام/ملتر وحضنت تحت حرارة 37 °م لمدة 60 دقيقة.

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات
معلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

اضيف 200 مايكروغرام من انزيم Proteinase K أو 10 مايكروولتر من المحلول الخزين
20 مليغرام/مللتر وحضنت تحت حرارة 50 °م لمدة 60 دقيقة. اضيف حجم متساو الى
العينة من خليط (25:24:1) Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol وخلطت
باستعمال الهزاز لمدة 30 ثانية ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق
تحت حرارة 4 °م. نقل الجزء الطافي الى انبوبة Eppendorf جديدة واستخلص الدنا مرة
اخرى مع خليط (25:24:1) Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ومن ثم نبذت
مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 °م ونقل الجزء الطافي الى
انبوبة جديدة. اضيف 500 مايكروولتر من الكلورفورم ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000
دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 °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 حجامان من
مادة الأيثانول Ethanol ايضاً بتركيز 95% وخلط جيداً وحضنت العينة عند حرارة 20- °م
لمدة 30 دقيقة لغرض ترسيب الدنا. نبذت العينة مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 30
دقيقة تحت حرارة 4 °م. تخلص من الجزء الطافي وغسل الجزء الراسب (الدنا) باستخدام
كحول الأيثانول بتركيز 70% ونبذت العينة مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق
تحت حرارة 4 °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 مايكروولتر من
TE buffer (0.1 ملي مولار من مادة EDTA و10 ملي مولار من مادة Tris-HCl
والأس الهيدروجيني لهذا الدارئ 8، وحضر باستخدام الماء الخالي من انزيم النيوكليز
المعقم Nuclease-Free water، وحفظت العينة بعد ذلك تحت حرارة 20- °م.

التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستخدام تقانة SSR-PCR

درس التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستخدام تقانة تكرار التسلسل البسيط -SSR
PCR. حضر الخليط الأساس Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب المصدر Nagy
(2007). *et al.*، مع بعض التحوير. حضر الخليط 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 مايكروملتر وبتركيز 1X
والبوادئ Primer بحجم 2.5 مايكروملتر وبتركيز 1 مايكرومولر وقالب الدنا DNA

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات
معلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

template بحجم 2 مايكرولتراً وبتركيز 100 نانوغرام وكان الحجم الكلي للتفاعل 25 مايكروملتراً. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف كانت لمسح قالب Denature template بدرجة حرارة 94 °م ولمدة 3 دقائق والمسح الابتدائي Initial denaturation بدرجة حرارة 92 °م لمدة 60 ثانية والتحام البادئ Annealing بدرجة حرارة 60 °م ولمدة دقيقة واحدة والأستطالة Extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة دقيقة واحدة والأستطالة النهائية Final Extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 7 دقائق. مراحل المسح الابتدائي والتحام البادئ والأستطالة كانت لـ 35 دورة. حملت 10 مايكرولتراً من نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البوادئ أعلاه لعينات الفلفل الحلو وأضيفت لها 10 مايكرولتراً من دارئ التحميل Loading buffer (فورموميد بتركيز 98%، EDTA (pH 8) 10 ملي مولر، بروموفينول الأزرق بتركيز 0.005% و Xylene cyanol بتركيز 0.005%). مسخ Denatured ناتج التفاعل تحت حرارة 95 °م ولمدة 5 دقائق ومن ثم وضع مباشرة على الثلج. اخذ 5 مايكرولتراً من هذا الناتج لكل عينة وحملت العينات في المكان المخصص لها على هلام المتعدد اكريلاميد 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 باتجاه 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 اكريلاميد بصبغة الأنيديوم بروميد Ethidium bromide (EtBr) بتركيز 10 مليغرام/ملتر 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 متخصص Past software ver. 1.92

(Hammer, 2001). درست العلاقة الوراثية بين ضروب الفلفل الحلو المدروسة باستعمال تقانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)، إذ درست شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي كما درس البعد الوراثي بالأعتماد على نسبة التشابه Euclidean coefficient بين عينات الفلفل الحلو المدروسة. حسبت النسبة المئوية لعدد الحزم المتعددة الأشكال Polymorphic bands بتقسيم عددها على عدد الحزم الرئيسية مضروباً في 100، بينما استخرجت كفاءة التوافق بين البودئ (%) Primer efficiency بتقسيم عدد الحزم احادية الشكل على العدد الكلي للحزم احادية الشكل مضروباً في 100، كما حسبت قوة الفعالية التمييزية (%) 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

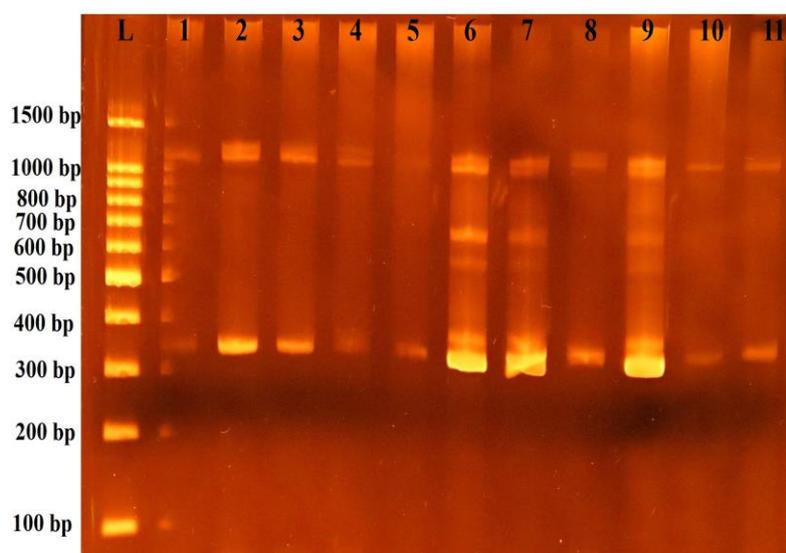
درس التباين الوراثي بالأعتماد على تقانة SSR-PCR وباستعمال ستة بودئ في جميع العينات. انتجت البودئ الستة 33 حزمة في جميع العينات انتج منها البادئ الأول EPMS-342 سبع حزم في عينات الفلفل المدروسة وبعدها اربع حزم احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة و3 حزم متعددة الأشكال Polymorphic bands وبنسبة مئوية 42.86% وكان كفاءة التوافق 44.45% مع قوة فعالية تمييزية 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 وبعدها 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 وبعدها 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

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

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 السادس GPMS-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

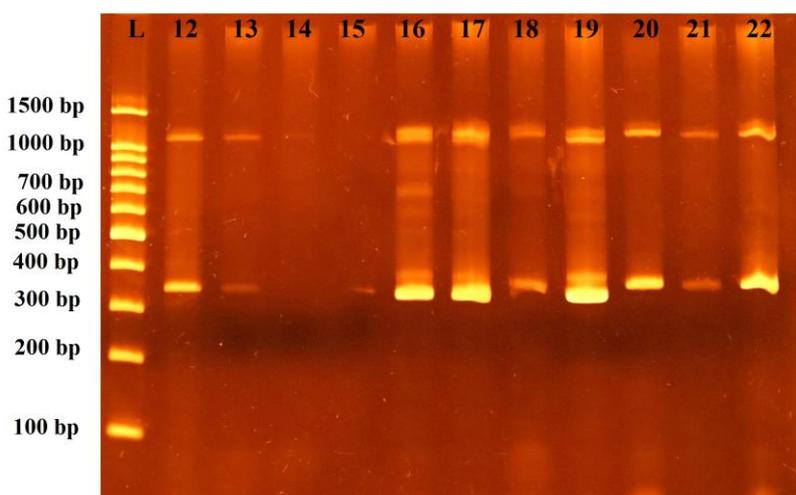
البوادئ	عدد الحزم الأحادية الشكل	عدد الحزم المتعددة الأشكال	النسبة المئوية للحزم المتعددة الأشكال (%)	كفاءة التوافق بين البوادئ (%)	قوة الفعالية التمييزية (%)
البادئ الأول EPMS-342	4	3	42.86%	44.45%	12.5%
البادئ الثاني EPMS-397	0	4	100%	0%	16.7%
البادئ الثالث EPMS-426	2	5	71.43%	22.22%	20.8%
البادئ الرابع 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 (أ1): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-342 وتقانة SSR-PCR

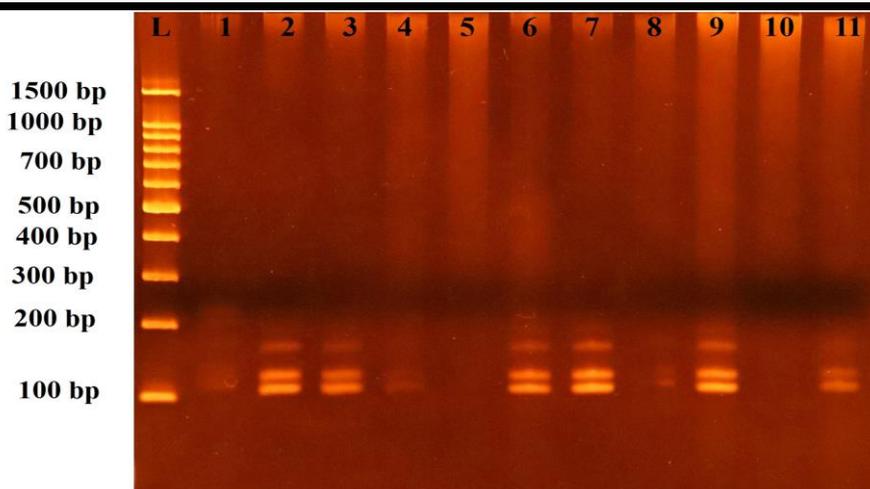
L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 1: فلفل اردني برتقالي، 2: فلفل اردني أحمر، 3: فلفل اردني اصفر، 4: فلفل اردني اخضر، 5: فلفل اسباني اخضر، 6: فلفل عراقي/بلاد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



شكل (أب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

الفلفل الحلو باستعمال البادئ EPMS-342 وتقانة SSR-PCR

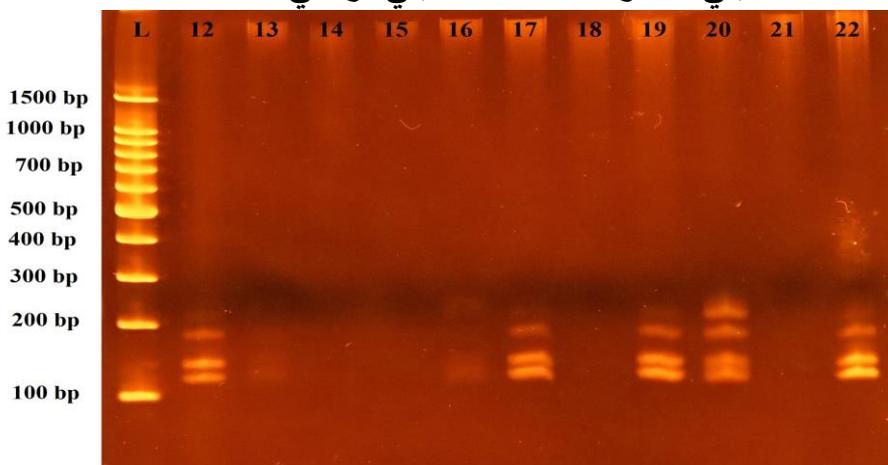
L: الدليل الحجمي (1500 زوج قاعدة)، 12: فلفل اسباني طويل اخضر، 13: فلفل ايراني احمر، 14: فلفل ايراني برتقالي، 15: فلفل ايراني اصفر، 16: فلفل ايطالي احمر، 17: فلفل ايطالي برتقالي، 18: فلفل ايطالي اصفر، 19: فلفل ايطالي اخضر، 20: فلفل اسباني احمر، 21: فلفل اسباني طويل احمر، 22: فلفل ايراني اخضر.



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.

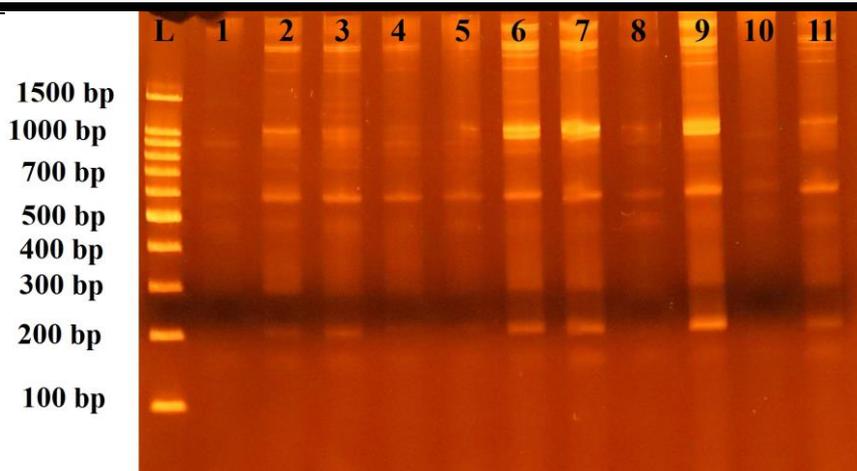


شكل (2ب): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

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.

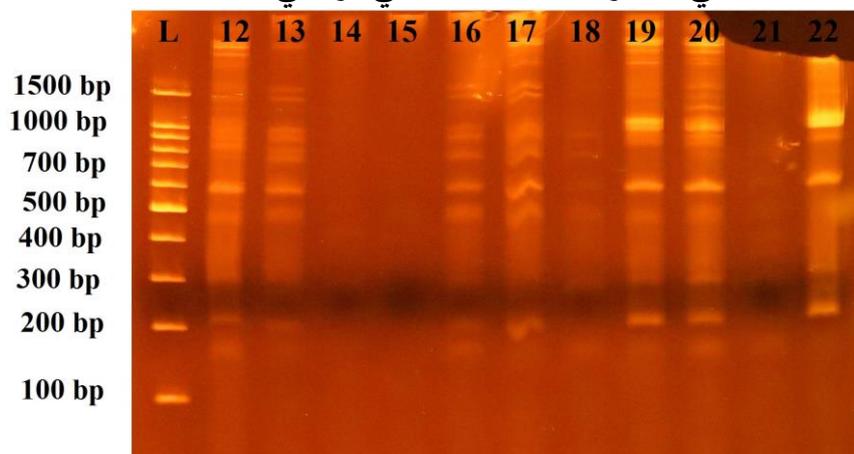
تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي



شكل (أ3): 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/بلاد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.

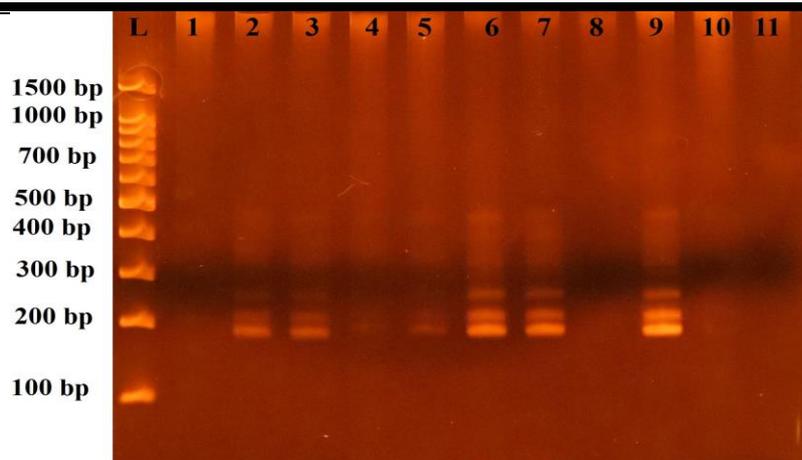


شكل (ب3): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

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.

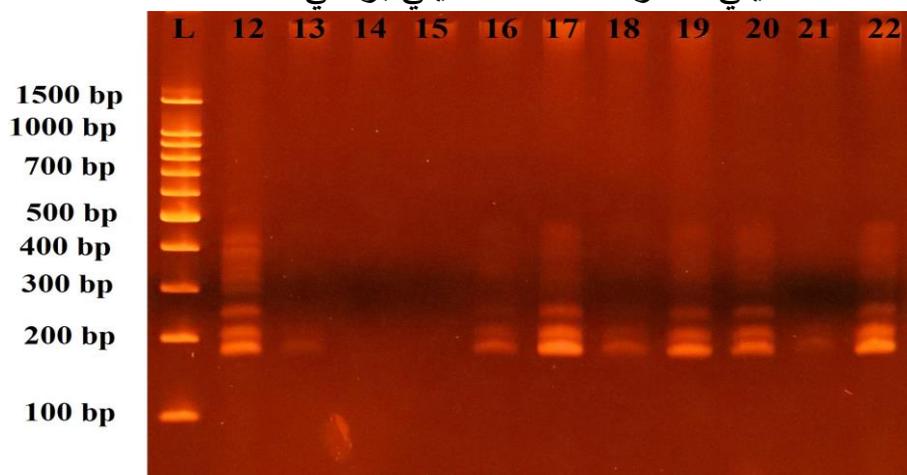
تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي



شكل (أ4): 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.

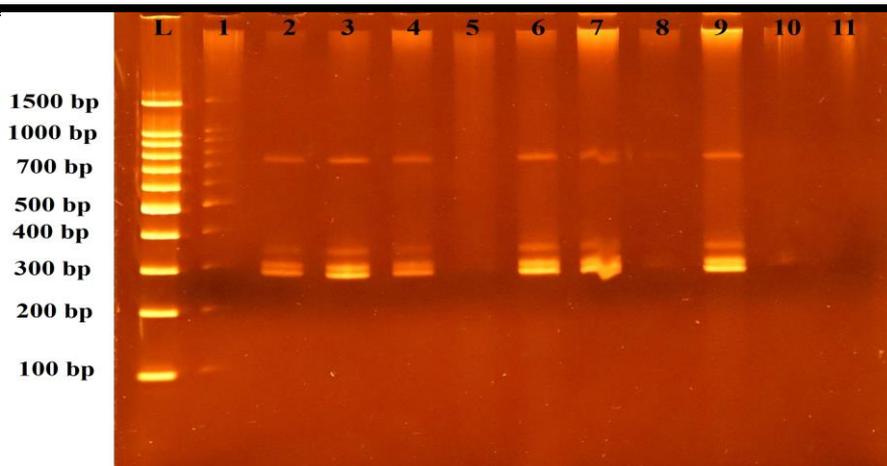


شكل (ب4): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

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.

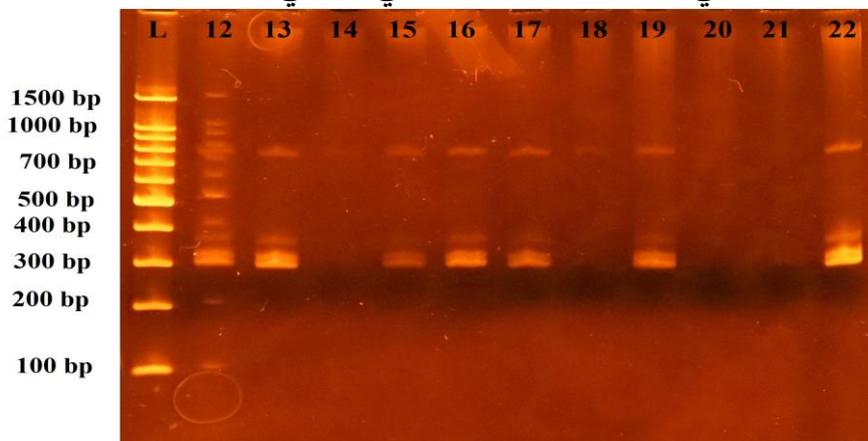
تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي



شكل (أ5): 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.

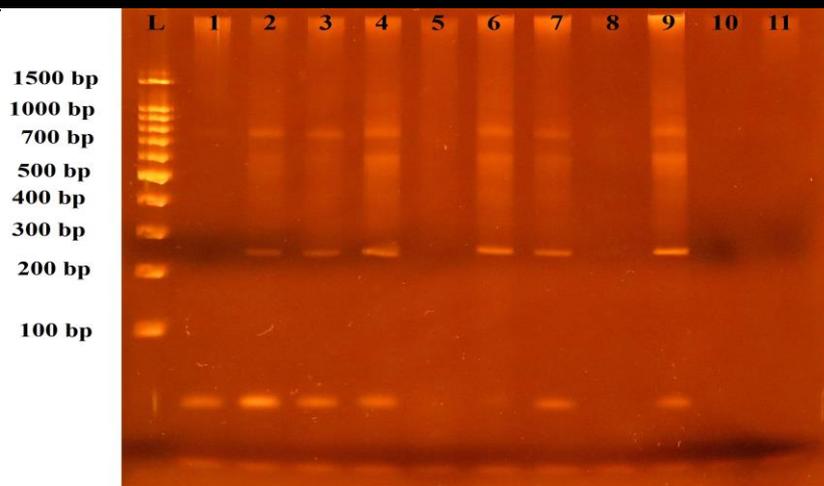


شكل (ب5): الترحيل الكهربائي لهلام المتعدد اكريلمايد بتركيز 6% لدنا ثمار

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.

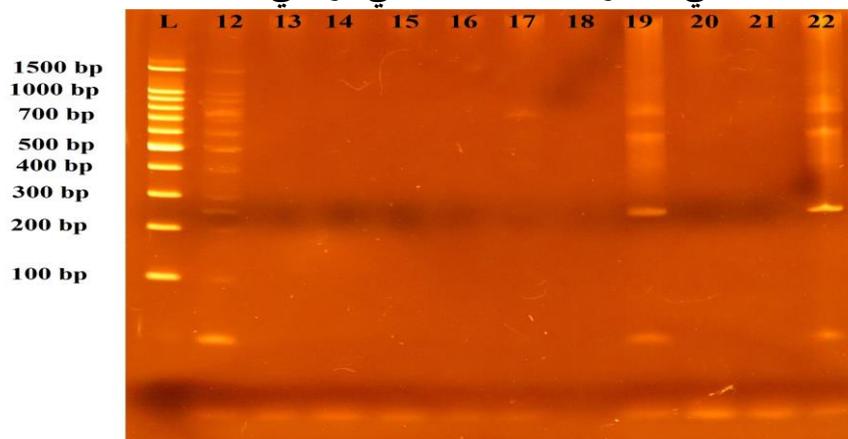
تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي



شكل (أ6): 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/بلاد اخضر، 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 8: فلفل صيني احمر، 9: فلفل عراقي/صويرة اخضر، 10: فلفل صيني اصفر، 11: فلفل صيني برتقالي.



شكل (ب6): 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)، إذ سجل البادئ Epms-342 أربع حزم متعددة الشكل وثلاث حزم للبادئ Epms-397 وأربع حزم متعددة للبادئ Epms-426 وكذلك للبادئ Gpms-29 و Epms-501 وخمس حزم للبادئ Gpms161، أما في دراسة (Nicolai et al. (2013) فقد سجل البادئ Epms397 اليلاً والبادئ Epms 426 اليلاً والبادئ Epms342 اليلاً والبادئ Gpms161 اليلاً والبادئ Gpms29 اليلاً وهذا أيضاً مخالف لعدد الأليلات الناتجة في الدراسة الحالية وقد يرجع السبب إلى اختلاف طرائق الكشف عن ناتج تضخيم هذه البوادئ، إذ قد يعود السبب إلى اختلاف الأنماط الجينية للفلفل المستعملة في الدراسات المذكورة. قدر تباين واصمات SSR لنموات من الفلفل المزروعة في معهد Crop research Institute, Prague-Ruzyne, Department of vegetables and special crops in Olomouc وباستعمال ثمانية واصمات لـ 41 نمواً Accession من الفلفل الأحمر وظهرت النتائج طيفاً موحداً Uniform spectra (اليل واحد فقط) في جميع النموات المدروسة عند استعمال ثلاثة من هذه الواصمات Hpms 1-168، Hpms 1-1 و Hpms 1-274، أما الخمسة الباقية فتتراوح 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 تشابهاً عالياً بين بعض النموات التي كان من المفترض أنها متباينة (Rodrigues et al., 2009)، أما 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، إذ لوحظ نقصان في النباتات ذات الزيجات المتباينة Heterozygotes ضمن المجموعة السكانية بأكملها، مما يشير إلى أن معظم الضروب المزروعة في المنطقة مستمدة من التزاوج الداخلي Inbreeding فيما بينها وأن تقدير التباين الوراثي الكلي لضرب من محصول مستزرع ضمن منطقة جغرافية يمكن أن يعطي مؤشراً لمدى اعتماد المزارعين التقليديين على البذور من الضروب الطبيعية لإنتاج محاصيلهم، وقد بين (Ince et al. (2010) عند استعمال 45 زوجاً من واصمات SSR لعدة أنواع من الفلفل وعدة اجناس من العائلة الباذنجانية مثل الطماطا، البطاطا، الباذنجان والتبغ وأن أزواج الواصمات قد ضخمت مجين كل من: *C. baccatum* L.، *C. chacoense*، *Capsicum annuum* L.، *C.*

chinense L.، *C. grutescens* L. و *C. pebescens*، مما يشير الى امكانية استعمال هذه الواصمات مع جنس *Capsicum* وهي ذات تكرارات ثنائية النيوكليوتيدات، 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 التباير 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 لـ *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 PAUSE 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 لواصلات SSR في المادة الوراثية للفلفل بعد استعماله لاكثر من 102 واصماً كان 25 منها فقط ذا تعدد شكلي بعد فحصه لسته 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 الأليلات 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 بالأعداد 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

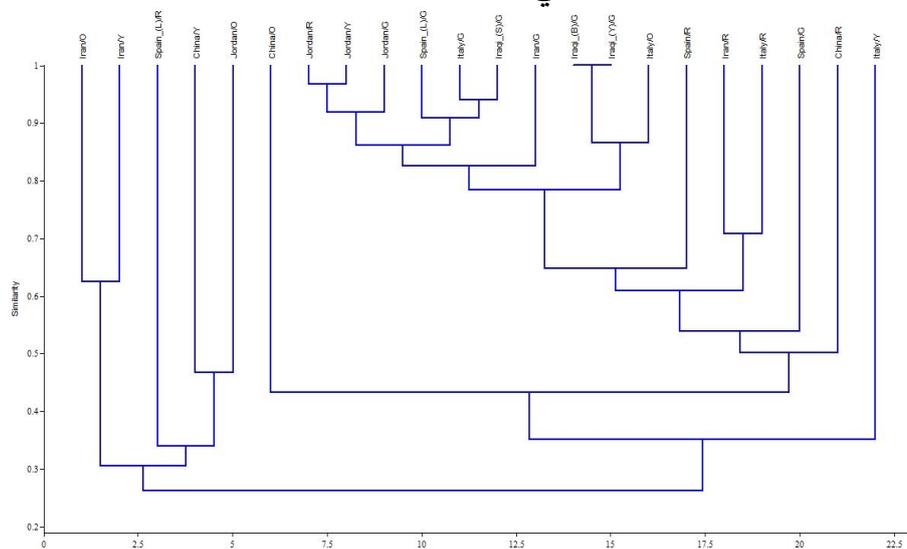
Jaccard للتشابه الوراثي. يتضح من الشكل (7) بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي في عشر مجاميع رئيسية. المجموعة الأولى ضمت ثمار الفلفل الحلو الإيراني البرتقالي والأصفر والمجموعة الثانية ضمت ثمار الفلفل الحلو الأسباني الطويل الأخضر، أما المجموعة الثالثة فضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني الأصفر والفلفل الأردني البرتقالي والمجموعة الرابعة ضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني البرتقالي، بينما المجموعة الخامسة ضمت ثمار الفلفل الحلو الإيطالي الأصفر. المجموعة السادسة ضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني الأحمر، بينما ضمت المجموعة السابعة ثمار الفلفل الأسباني الأخضر، أما المجموعة الثامنة فضمت عيني الفلفل الحلو الإيطالي الأحمر والأيراني الأحمر. المجموعة التاسعة فضمت الفلفل الحلو الأسباني الأحمر، أما المجموعة العاشرة والأخيرة فتكونت من اثنين من تحت المجموعة. ضمت تحت المجموعة الأولى ثمار الفلفل الحلو الإيطالي البرتقالي والفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية، بينما ضمت تحت المجموعة الثانية ثمار الفلفل الحلو الإيراني الأخضر والعراقي/صويرة، الإيطالي الأخضر، الأسباني الطويل الأخضر، والأردني الأخضر والأصفر والأحمر. لقد أوضح هذا المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية الأخضر ونسبة 1 وهي أعلى قيمة تشابه بالمقارنة مع أقل تشابه لعينة الفلفل الأسباني الطويل الأخضر بقيمة 0.35. نسبة التشابه العالية قد ظهرت أيضاً بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأصفر والأحمر بقيمة 0.98 وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/صويرة الأخضر وثمار الفلفل الحلو الإيطالي الأخضر بقيمة 0.94. ثمار الفلفل الحلو الإيطالي البرتقالي والعراقي/بلد واليوسفية الأخضر (يقعان في نفس تحت المجموعة) أظهرتا تشابهاً بقيمة 0.88. ثمار الفلفل الحلو الإيطالي الأحمر والأيراني الأحمر قد أظهرتا تشابهاً بقيمة 0.72. المجاميع الرئيسية الثلاثة الأولى قد أظهرتا تشابهاً بعيداً عن بقية العينات الأخرى بقيمة 0.26.

في دراسة أجريت لغرض تحديد وتقييم فعالية واصمات SSRS في تشخيص ضروب الفلفل وذلك بمقارنتها مع الصفات المظهرية في اختبار التميز، الانتظام والاستقرارية Distinctiveness, Uniformity, stability (DUS) فقد استعمل 27 واصماً من SSR وكانت جميعها ذات تعدد شكلي Polymorphic في دراسة 66 ضرباً من ضروب الفلفل، إذ انتجت هذه الواصمات 89 اليلاً، وباستعمال التحليل العنقودي Cluster analysis فقد فصلت الضروب إلى ثلاث مجاميع رئيسية، 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*، إذ 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 خطأً من خطوط الفلفل البري والمدجن، وقد ظهرت فائدة هذه الواصمات الجديدة من خلال رسم شجرة القرابة التي بنيت استناداً الى التعدد الشكلي للتتابع 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 هنكاريًا قد وضعت في مجموعة منفصلة عن الأصناف المدجنة ذات الثمار الكبيرة، كذلك انفصلت انماط الفلفل الأحمر البارد الهنكاري (البابريكا) عن الخطوط التجارية للفلفل، بينما (Sonnante and Pignone, 2007) اشار 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 الانتخاب المحلي الإضافي لها بعد استقرارها في المنطقة. لأجل تحديد التباير في جنس الفلفل عموماً ولأختيار المجموعات المشتركة Co-collections وتوسيع التنوع الوراثي والمظهري، فقد فحصت مجموعة من احد عشر نوعاً من الفلفل عائدة لـ 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. *glabrusculum* (Nicolai *et al.*, 2013)، اما الباحث Rai *et al.* (2013) فاستعمل واصمات SSR باستعمال تقانة Random amplified

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

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 التباير ضمن الأنماط التي لا تنتمي الى نوع *C. annuum* L. كان اكبر من التباير 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 بالأعتداد 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/بوسفية الأخضر وعينة الفلفل الإيراني البرتقالي وبقية 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 أبعادها الوراثية بين 1.0 و 5.656.

إن الآف السنين من الانتخاب الصناعي في البيئات المختلفة قد أدى إلى ظهور طفرات جديدة وتوافقات اليلية Allele combination ذات أهمية زراعية (Nicolaì et al., 2013). التغيرات الجينية بين أنماط الفلفل *C. annuum* يكون قليلاً في الأنماط البرية وشبه البرية وهذا متوقع لأنه خلال عملية التدجين كل أنواع المحاصيل تقريباً تعاني انخفاضاً في التنوع الجيني (Gepts, 2004 ; Oyama et al., 2006)، كما أن سبب صعوبة التفريق بين الأصناف التجارية المهجنة من الفلفل Commercial pepper varieties يعود إلى تنوعها الجيني الواسع الناتج عن التعدد الشكلي الجزيئي المنخفض (Lefebvre et al., 2005 ; Kwon et al., 2001)، إن الانتخاب المستمر لخطوط التربية ذات الصفات المرغوبة تجارياً أدت إلى تضيق التنوع الوراثي في العديد من أنواع المحاصيل (Ince et al., 2009) وهذا ما أكدته Ortiz et al. (2010) عندما بينوا أن التغيرات في ثمار الفلفل الحلو اضيق من التغيرات في ثمار الفلفل الحار Chili وأن معظم الأنواع المدجنة فقدت تغيراتها الجينية عند بدء عملية التدجين ومما زاد الأمر سوءاً هجرة هذه الأنواع من مواقعها الأصلية إلى مواقع أخرى مختلفة (Tang et al., 2010). في دراسة لأنواع الفلفل المكسيكي البري والمدجن كانت النتائج تشير إلى تغير وراثي عال بين وضمن *C. annuum* على عكس الدراسات السابقة في المكسيك التي أجريت على عينات مأخوذة من بنك المادة الوراثية Germplasm bank وظهر انخفاض طفيف للفلفل المدجن المأخوذ من سبعة مواقع مختلفة وقد عزى الباحثون هذا الاختلاف إلى أثر التدجين على التغيرات الجينية للمجاميع المدجنة مقارنة مع التجمعات البرية (Pacheco-Olvera et al., 2012).

تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات
معلية ومستوردة في العراق إحسان عرفان حسين شيما صباغ مهدي

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	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

- 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.
- Dhaliwal, M. S. ;Yadav, A. and Jindal, S. K. (2014). Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. Afr. J. Biotechnol. 13(31):3137-3143.
- 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.
- 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. Nicolai, M ; Cantet, M. ; Lefebvre, V. ; Sagepalloix, A. M. and Palloix, A. (2013). Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* 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.; Reijman, 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 Stavělikova, 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). A hypervariable 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. ; Lincoln, 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 transposon- 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 (*Capsicum 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., Tsuru, 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 Ganai, M. (2007). Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome.* 50:668-688.
35. Nicolai, 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 Electronica.* 4(1):1-9.
39. Rodrigues, K. F. and Tam, H. K. (2010). Molecular markers for *Capsicum 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 T135 markers 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 domesticated 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. *Theor 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-A case 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.