



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم

دراسة التنوع الوراثي لضروب مختلفة من الفلفل الحلو  
*Capsicum annuum* L. لعينات من الأسواق المحلية  
باستعمال بعض التقانات الوراثية الجزيئية

اطروحة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد وهي جزء  
من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة / علم النبات / علم الوراثة

من قبل

شيماء صباح مهدي

ماجستير علوم - علوم الحياة - كلية العلوم للنبات - جامعة بغداد

2004

بإشراف

أ.م.د. احسان عرفان حسين

م 2016

هـ 1437

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَأَنْزَلَ اللَّهُ عَلَيْكَ الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَعَلَّمَكَ مَا

لَمْ تَكُن تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا﴾

صدق الله العظيم

سورة النساء الآية (113)

## اقرار المشرف على الأطروحة

اشهد ان اعداد هذه الأطروحة قد جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم/جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة/علم النبات/علم الوراثة.

التوقيع:

المشرف: د. احسان عرفان حسين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ:

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية اعلاه المقدمة من قبل الأستاذ المشرف الأستاذ المساعد الدكتور احسان عرفان حسين، ارشح هذه الأطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

رئيس القسم: ا.م.د. مازن نواف عبود

المرتبة: استاذ مساعد

التاريخ:

## اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه، نشهد اننا اطلعنا على الأطروحة الموسومة: دراسة التنوع الوراثي لضروب مختلفة من الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات من الأسواق المحلية باستعمال بعض التقانات الوراثية الجزئية المقدمة من قبل الطالبة (شيماء صباح مهدي) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة/علم ال / ، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 2016/7/13 ووجدناها مستوفية لمتطلبات درجة الدكتوراه في العلوم وعليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير (امتياز).

### عضو اللجنة

التوقيع:  
الأسم : د. كريمة محمد وهيب  
المرتبة: استاذ  
العنوان: جامعة بغداد/كلية الزراعة  
التاريخ:

### عضو اللجنة

التوقيع:  
الأسم : د. عبد الصاحب كاظم علي  
المرتبة: رئيس باحثين  
العنوان: وزارة العلوم والتكنولوجيا  
التاريخ:

### عضو اللجنة

التوقيع:  
الأسم : د. مازن نواف عبود  
المرتبة: استاذ مساعد  
العنوان: جامعة بغداد/كلية التربية للعلوم  
الصرفة-ابن الهيثم  
التاريخ:

### عضو اللجنة

التوقيع:  
الأسم : د. عذراء حميد حسون  
المرتبة: استاذ مساعد  
العنوان: جامعة بغداد/ كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم  
التاريخ:

### رئيس اللجنة

التوقيع:  
الأسم : د. عبد مسرت احمد الجميلي  
المرتبة: استاذ  
العنوان: جامعة الأنبار/كلية الزراعة  
التاريخ:

### عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:  
الأسم : د. إحسان عرفان حسين  
المرتبة: أستاذ مساعد  
العنوان: جامعة بغداد/ كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم  
التاريخ:

### مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة- بن الهيثم/جامعة بغداد

التوقيع:

الأسم : د. خالد فهد علي

المرتبة: استاذ

العنوان: جامعة بغداد/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم

التاريخ:

# الاهداء

الى المبعوث رحمة للعالمين وحامل علم الأولين والآخرين سيدنا

محمد ( ) ...

الى من ترافقتني في كل لحظة ذنراه، الى من احسن الظن بي واوصلني لكل

خير بفضل دعاه ..... أبي رحمه الله

الى جنتي وقودتي وقوتي ... أمي حفظها الله

الى من كانت لي عوناً في شدتي ... أختي

الى سندي في حياتي ... أخي

الى رفيق دربي وانيس رحلتي الذي تحمل تقصيري في حقه طيلة مدة

دراستي .... زوجي الحبيب

الى زهرتي حياتي .... ابنتي مريم وميار

اهدي جهدي المتواضع هذا .

شيماء .....

## الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد ومن اتبعه بإحسان الى يوم الدين. بدءاً أتقدم بشكري وامتناني الى استاذي ومشرفي الأستاذ المساعد الدكتور احسان عرفان حسين لاشرافه على دراستي وتقديراً لتقديم توجيهاته السديدة التي اغنت الأطروحة علماً وريانة، كما أتقدم بشكري وتقديري الى الأستاذ المساعد الدكتور سعد الندا رحمه الله لملاحظاته وارشاداته القيمة التي قدمها لي خلال مدة الدراسة، كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى السيد عميد كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم الأستاذ المساعد الدكتور خالد فهد علي وإلى السيد رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ المساعد الدكتور مازن نواف عبود. ومن الواجب ان أتقدم بالشكر والتحية المملوثة بالوفاء والحب والتقدير الى الأخوة والأخوات كل من السيد انور عبد ناصر والمدرس المساعد اريج عبد الستار فرمان والمدرس المساعد سلوى علي غانم لوقوفهم معي ومساندتي طيلة مدة الدراسة العملية. وأختتم قولي بالدعاء الى الله عز وجل ان يجعل عملي هذا خالصاً لوجهه الكريم وصدقة جارية في ميزان حسناتي.

شيماء .....

## الخلاصة

درس التباين الوراثي في 22 عينة محلية ومستوردة من ثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. التي جمعت من الأسواق المحلية العراقية باستخدام بعض المعلمات الجزيئية ، فضلاً عن تعيين ترميز مادة الكاروتينات Carotenoids في ثمار الفلفل الحلو باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High-performance liquid chromatography (HPLC)، كما كشف عن ثلاثة من الجينات المسؤولة عن إنتاج هذه المادة وهي - Lycopene Capsanthin-capsorubin synthase و -carotene hydroxylase (*Crtz-2*) cyclase (*Lcyb*) (*Ccs*) مع اجراء التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing لهم.

درس التباين الوراثي باستخدام تقانة عديد التكوين ذات القطعة الطولية المضخمة Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ولثلاثة توافقات بين البوابد المستخدمة في جميع العينات. انتج التوافق الأول  $E_{ACG}/M_{AGG}$  اربعة حزم في عينات الفلفل المدروسة ويعد ثلاثة حزم احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة، ما عدا عيني الفلفل الأردني البرتقالي والأحمر التي انتجت اربع حزم في كل عينة كانت واحدة منها متعددة الأشكال Polymorphic bands و  $\approx 25\%$  كفاءة التوافق Primer efficiency  $21.43\%$  مع قوة فعالية تمييزية Discriminatory power  $100\%$  في  $E_{AAG}/M_{AAT}$  . كل عينة كانت جميعها احادية الشكل ولم  $\approx 28.57\%$  مع قوة فعالية تمييزية  $0\%$ ، بينما  $E_{ACA}/M_{CTG}$  حزم في كل عينة كانت جميعها حادية الشكل، ما عدا عينة الفلفل /  $50\%$  مع قوة فعالية تمييزية بنسبة  $0\%$ . رسمت شجرة القرابة الوراثية باستخدام Jaccard العينات ضمن التحليل العنقودي في الأردني الأحمر والبرتقالي، بينما المجموعة الثانية فقد ضمت الفلفل / عينات .

المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأحمر والبرتقالي مع عينات الفلفل الأخضر ما عدا  
 / 0.94 ، بينما كانت قيمة عينة الفلفل  
 / 0.68 على قيمة يعد وراثي بين عيني ثمار الفلفل  
 / وقيمة 2.236

### اليسيط (SSR-PCR) Simple Sequence Repeat

وأن هذه البوادي قد انتجت 33 Polymorphic 24 bands، بينما كان Monomorphic bands. رسمت شجرة القرابة الوراثية  
 بينت النتائج بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي Jaccard  
 في عشرة مجاميع رئيسية. وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/بلد واليوسفية  
 الأخضر ونسبة 1 وهي اعلى قيمة تشابه بالمقارنة مع اقل تشابه لعينة الفلفل الأسباني الطويل  
 الأخضر وقيمة 0.35 لية قد ظهرت ايضاً بين ثمار الفلفل الحلو الأردني الأصفر  
 0.98 وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/صويرة الأخضر وثمار الفلفل الحلو الإيطالي  
 الأخضر وقيمة 0.94. بأن اعلى قيمة يعد وراثي بين عيني ثمار الفلفل الحلو  
 / الأخضر والفلفل العراقي/يوسفية الأخضر وعينة الفلفل الأيراني البرتقالي وقيمة 5.656، بينما  
 كان اقل يعد وراثي بين عيني ثمار الفلفل الحلو الأردني الأخضر إذ كانت القيمة مساوية إلى  
 1.0

### الدنا متعدد الأشكال المضخم عشوائياً Random amplified polymorphic

DNA (RAPD-PCR) كانت نسبة التعدد الشكلي لجميع البوادي 100%  
 ظهور حزمة متميزة واحدة وحجم جزئي 1800 ستعمل البادي C52، بينما لم تنتج  
 حزم متميزة. نتائج شجرة القرابة الوراثية التي رسم Jaccard  
 ت العينات ضمن التحليل العنقودي  
 وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/اليوسفية الأخضر وثمار الفلفل الحلو



0.84 مقارنة مع تشابه وقيمة صفر بين ثمار الفلفل الحلو الإيراني الأصفر وبين

عينات ثمار الفلفل الحلو الأخضر. ظهرت قيم الـ *ycb* الوراثي بين عي

قيمة كانت بين عيني ثمار الفلفل الحلو الصيني الأصفر والإيراني الأخضر وقيمة 5.0 بينما كان

وراثي بين عيني ثمار الفلفل الحلو الأسباني الأخضر والأيطالي الأصفر كانت القيمة مساوية 1.0.

أعلى ترميز للبيتا-كاروتين في عينة الفلفل الإيطالي الأصفر وقيمة 1415.73

مايكروغرام/مليتر بالمقارنة مع أقل قيمة 94.32 مايكروغرام/مليتر في الفلفل الإيراني الأخضر.

كانت أعلى قيمة في الفلفل الأصفر في العينة الإيطالية وأقل قيمة للون كان في عينة الفلفل الإيراني

الأصفر وقيمة 710.89 مايكروغرام/مليتر، أما أعلى ترميز للبيتا-كاروتين للفلفل البرتقالي فكان في العينة

البرتقالي. الفلفل الأحمر قد سجل أقل قيمة لترميز البيت-كاروتين وهي 245.27 مايكروغرام/مليتر في عينة

الفلفل الأردني الأحمر، بينما سجل الفلفل الأسباني الأحمر أعلى قيمة وهي 435.41 مايكروغرام/مليتر.

على قيمة في عينة الفلفل الإيطالي وقيمة 232.43 مايكروغرام/مليتر بالمقارنة

98.86 مايكروغرام/مليتر في عينة الفلفل العراقي/صويرة الأخضر.

الجينات التي لها علاقة بتصنيع البيت-كاروتين Polymerase

الترحيل الكهربائي لهلام الآكاروز بترميز 2%. وجد الجين *Lcyb* chain reaction (PCR)

11 عينة فلفل مدروسة باستخدام البوادي الخارجية External primers بينما

الترحيل الكهربائي قطعة مضخمة في 19 عينة فلفل 360

البوادي الداخلية Internal primers. وجد الجين *Crtz* باستخدام البوادي الخارجية في عينة الـ

1500 زوج قاعدة، بينما أظهر الترحيل الكهربائي قطعة /

3 عينات هي الفلفل الأردني البرتقالي، عراقي/يوسفية والفلفل الإيراني

760 . وجد الجين *Ccs* باستخدام البوادي

الخارجية في عينة الـ / وحجم جزئي 1500

زوج قاعدة، بينما ا رحيل الكهربائي قطعة مضخمة في 7 عينات

490

بينت نتائج التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Lcyb* من عينات الفلفل الحلو الأخضر لى وجود تشابه كبير بين التسلسلات التتابعية لقطعة الجين المدروسة والتسلسل التتابعي القياسي Refseq لجين ختلافات لبعض القواعد النايروجينية بين العينات المدروسة.

بين التسلسلات التتابعية في عينات الفلفل الحلو المدروسة بين عينة الفلفل العراقي/الصورة الأخضر وبين عينة الفلفل الأيراني الأخضر بقيمة 0.903، بينما اقل قيمة تشابه فقد وجدت بين عينة الفلفل الأردني الأصفر وعينة الفلفل الصيني الأصفر بقيمة 0.539. بينت

الجين *Crtz* وجود نوعين من التغيرات الجينية هي Substitution Deletion

س. استبدال القاعدة النايروجينية الكوانين G بالقاعدة النايروجينية الثايمين T

في الموقعين 846 850 استبدال القاعدة النايروجينية الثايمين T بالقاعدة النايروجينية السايوسين C

تبدال القاعدة النايروجينية السايوسين C 852 860 861 862

النايروجينية الأدينين A في الموقعين 856 862 استبدال القاعدة النايروجينية السايوسين C

النايروجينية الثايمين T الموقعين 864 870. أيضاً كانت موجودة، إذ حذفت القواعد

النايروجينية ATA من قطعة الجين *Crtz* في عينة الفلفل الأردني البرتقالي بالمقارنة مع التسلسل التتابعي

Refseq. بينت نتائج التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Ccs* من عينات الفلفل الحلو

لى وجود تشابه كبير بين التسلسلات التتابعية لقطعة الجين المدروسة والتسلسل التتابعي القياسي

Refseq لجين ختلافات لبعض القواعد النايروجينية بين العينات المدروسة ك

بين التسلسلات التتابعية في قطع الجين

*Ccs* بين عينة الفلفل الإيطالي البرتقالي وبين عينة الي الأخضر بقيمة 0.966، بينما ا

تشابه فقد وجدت بين عينة الفلفل العراقي/بلد الأخضر وعينة الفلفل الإيطالي الأخضر بقيمة 0.611.

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	الفقرة
<b>الفصل الأول</b>		
6-1	المقدمة	1
<b>الفصل الثاني</b>		
47-7	استعراض المراجع	2
7	Genetic diversity in plants	1-2
8	Genetic diversity in pepper plant	2-2
10	Genetic markers الواصمات الوراثية	3-2
12	AFLP	1-3-2
19	SSR	2-3-2
22	RAPD	3-3-2
30	Carotenes in pepper الكاروتينات في الفلفل	4-2
36	الجينات المسؤولة عن تصنيع الكاروتينات	1-4-2
39	تصنيع الكاروتينات	2-4-2
42	تصنيع الكاروتيند	3-4-2
45	التسلسل التتابعي لدنا الجينات المسؤولة عن تصنيع الكاروتينات	5-2
<b>الفصل الثالث</b>		
75-48	المواد وطرائق العمل	3
48	والمحاليل	1-3
48	Instruments	1-1-3
49	Materials and solutions المواد والمحاليل	2-3
49	Fruit bell pepper samples عينات ثمار الفلفل الحلو	1-2-3
50	Dyes	2-2-3
50	صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي	1-2-2-3
50	Ethidium bromide (EtBr) صبغة الأيثيديوم برومايد	2-2-2-3

50	RNase	3-2-3
51	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	4-2-3
51	DNA extraction buffer	5-2-3
51	Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) ٤	6-2-3
52	Tris-EDTA (TE) ٤	7-2-3
52	خلات الصوديوم NaOAc بتركيز 3 ٤	8-2-3
52	Saturation of phenol ٤	9-2-3
53	خليط الفينول/الكلوروفورم/كحول الأيزوأميل	10-2-3
53	Ammonium persulphate (APS) محلول الأمونيوم بيرسلفيت	11-2-3
53	SSR- AFLP-PCR Loading buffer التحميل ٤ PCR	12-2-3
53	Proteinase K :	13-2-3
54	Restrictions enzymes :	14-2-3
54	دار٤ تفاعل التقطيع لل٤ :	15-2-3
54	T4 DNA ligase T4 انزيم رابط الدنا ٤	16-2-3
55	Adapter/ligation solution محلول تفاعل الوصلة المهيئة/الربط ٤	17-2-3
55	Agarose gel	18-2-3
55	محلول الأكرلاميد:المثليينيس أكرلاميد الخزن	19-2-3
56	هلام البولي أكرلاميد لعزل الدنا	20-2-3
56	خليط تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR mix	21-2-3
56	Primers ٤	22-2-3
57	AFLP-PCR ٤	1-22-2-3
58	Microsatellites-PCR ٤	2-22-2-3
58	RAPD-PCR ٤	3-22-2-3
59	البوادي المستعملة في تجارب تضخيم جينات <i>Ccs Crtz Lcyb</i>	4-22-2-3
60	DNA molecular weight markers :	23-2-3
60	ية الدنا الناتج من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	24-2-3

60	BigDye terminator V3.1	25-2-3
61	BigDye XTerminator Purification kit	26-2-3
61	Methods	3-3
61	Bell pepper	1-3-3
63	AFLP-PCR التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو	2-3-3
66	SSR-PCR التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو	3-3-3
68	RAPD-PCR التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو	4-3-3
70	استخلاص الكاروتينات من ثمار الفلفل	5-3-3
72	الكشف عن جينات <i>Ccs Crtz Lycb</i>	6-3-3
73	DNA sequencing	7-3-3
75	التحليل الأحصائي	8-3-3
<b>الفصل الرابع</b>		
<b>150-76</b>	<b>النتائج والمناقشة</b>	<b>4</b>
76	AFLP-PCR	1-4
82	مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) AFLP-PCR	1-1-4
85	قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو AFLP-PCR	2-1-4
86	SSR-PCR	2-4
98	مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) SSR-PCR	1-2-4
102	قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو SSR-PCR	2-2-4
104	RAPD-PCR	3-4
113	مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) RAPD-PCR	1-3-4

116	قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو = RAPD-PCR	2-3-4
118	تقدير ترميز البيتا-كاروتين-carotene - في عينات الفلفل الحلو	4-4
123	الكشف عن بعض جينات-carotene - في عينات الفلفل الحلو	5-4
123	الكشف عن الجين <i>Lcyb</i>	1-5-4
126	الكشف عن الجين <i>Crtz</i>	2-5-4
128	الكشف عن الجين <i>Ccs</i>	3-5-4
132	التسلسل التتابعي لقطع بعض الجينات الخاصة بتصنيع البيتا-كاروتين	6-4
133	المقارنة بين التسلسل التتابعي لقطعة من الجين <i>Lcyb</i> = Refseq لجين في بعض من عينات الفلفل الحلو	1-6-4
139	المقارنة بين التسلسل التتابعي لقطعة من الجين <i>Crtz</i> = Refseq لجين في بعض من عينات الفلفل الحلو	2-6-4
143	المقارنة بين التسلسل التتابعي لقطعة من الجين <i>Ccs</i> = Refseq لجين في بعض من عينات الفلفل الحلو	3-6-4
151	الاستنتاجات	
152	التوصيات	
173-153	المصادر References	
177-174	الملاحق	
178	البحوث المستقلة من الرسالة والمقبولة للنشر	
i-iii	Summary	

## قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-3	في هذه الدراسة	48
2-3	العينات المدروسة المحلية والمستوردة والمتحصل عليها من الأ	49
1-4	AFLP-PCR استعمال ثلاث توافقات بين البوادي	80
2-4	قيم الأبعاد الوراثية لعينات الفلفل المستوردة	87
3-4	SSR-PCR استعمال ست بوادي في عينات الفلفل	95
4-4	راثية لعينات الفلفل المستورد	103
5-4	كل والنسبة المئوية للتعدد الشكلي	107
6-4	راثية لعينات الفلفل المستوردة الأشكال مضخم عشوائياً RAPD-PCR	117
7-4	ترميز البيتا-كاروتين في عينات الـ HPLC	119
8-4	قيم التشابه بين التسلسلات المتتالية لقطعة من الجين <i>Lcyb</i> في عينات الفلفل	141
9-4	قيم التشابه بين التسلسلات المتتالية لقطعة من الجين <i>Ccs</i> في عينات الفلفل	146

## قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
13	تحضير القالب وربط الوصلة المهيأ	1-2
14	Preselective amplification	2-2
15	Amplified عديد fragment length polymorphism (AFLP)	3-2
41	ناء الكاروتينات	4-2
42	المسلك الأبيضي لبناء الكاروتينات في الفلفل البرتقالي	5-2
77	الترحيل الكهربائي AFLP-PCR $E_{ACG}/M_{AGG}$	1-4
77	الترحيل الكهربائي AFLP-PCR $E_{ACG}/M_{AGG}$	1-4
78	كرلمايد بترئيز 6% AFLP-PCR $E_{AAG}/M_{AAT}$	2-4
78	الترحيل الكهربائي AFLP-PCR $E_{AAG}/M_{AAT}$	2-4
79	الترحيل الكهربائي AFLP-PCR $E_{ACA}/M_{CTG}$	3-4
79	الترحيل الكهربائي AFLP-PCR $E_{ACA}/M_{CTG}$	3-4
84	AFLP-PCR Dendrogram Jaccard	4-4
89	EPMS-342 الترحيل الكهربائي SSR-PCR	5-4
89	EPMS-342 الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الياي SSR-PCR	5-4
90	EPMS-397 الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الياي SSR-PCR	6-4



90	EPMS-397	الترحيل الكهربائي SSR-PCR	6-4
91	EPMS-426	الترحيل الكهربائي SSR-PCR	7-4
91	EPMS-426	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي SSR-PCR	7-4
92	EPMS-501	الترحيل الكهربائي SSR-PCR	8-4
92	EPMS-501	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي SSR-PCR	8-4
93	GPMS-29	الترحيل الكهربائي SSR-PCR	9-4
93	GPMS-29	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي SSR-PCR	9-4
94	GPMS-161	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي SSR-PCR	10-4
94	GPMS-161	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي SSR-PCR	10-4
98	SSR-PCR	Dendrogram Jaccard	لعينات 11-4
105	OPB-01	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي RAPD-PCR	12-4
106	OPB-01	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي RAPD-PCR	12-4
106	OPB-12	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي RAPD-PCR	13-4
107	OPB-12	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي RAPD-PCR	13-4
110	OPB-15	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الياي RAPD-PCR	14-4

110	OPB-15 RAPD-PCR	الترحيل الكهربائي	14-4
111	C43 RAPD-PCR	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ	15-4
111	C43 RAPD-PCR	الترحيل الكهربائي	15-4
112	C52 RAPD-PCR	الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال البادئ	16-4
112	C52 RAPD-PCR	الترحيل الكهربائي	16-4
114	RAPD-PCR لعينات ثمار الفلفل	Dendrogram Jaccard	17-4
124		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Lycb</i> PCR	18-4
124		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Lycb</i> PCR	18-4
125		الترحيل الكهربائي الجين <i>Lycb</i> PCR	19-4
125		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Lycb</i> PCR	19-4
126		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Crtz</i> PCR	20-4
127		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Crtz</i> PCR	20-4
127		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Crtz</i> PCR	21-4
128		الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Crtz</i> PCR	21-4
129	بتريز 2% للكشف عن الجين <i>Ccs</i> PCR	الترحيل الكهربائي	22-4

129	الترحيل للكشف عن الجين <i>Ccs</i> PCR	22-4
130	الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Ccs</i> PCR	23-4
130	الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين <i>Ccs</i> PCR	23-4
135	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Lcyb</i> عينات الفلفل الحلو الأخضر والتسلسل النيكوتيدي القياسي	24-4
136	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Lcyb</i> عينات الفلفل الحلو الأصفر والتسلسل النيكوتيدي القياسي	25-4
137	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Lcyb</i> عينات الفلفل الحلو البرتقالي والتسلسل النيكوتيدي	26-4
138	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Lcyb</i> مر والتسلسل النيكوتيدي القياسي عينا	27-4
142	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Crtz</i> عينة الفلفل الأردني البرتقالي والتسلسل النيكوتيدي القياسي	28-4
144	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Ccs</i> عينات الفلفل الحلو الأخضر والتسلسل النيكوتيدي القياسي	29-4
145	Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين <i>Ccs</i> عينة الفلفل الإيطالي البرتقالي والتسلسل النيكوتيدي القياسي	30-4

## قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	رقم الملحق
175	لخاصة بتراكيز البيتا-كاروتين في عينات الفلفل المدروسة HPLC	1
178	رموز النيكوتينات الخاصة با تحاد الدولي للكيمياء IUPAC	2

## قائمة المختصرات

Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
Polymerase Chain Reaction	PCR
Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
Simple Sequence Repeat	SSR
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Phytoene Synthase	<i>PSY</i>
Selective Fragment Amplified	SRFA
Random Amplified Microsatellite Polymorphism	RAMPO
Inter Simple Sequence Repeat	ISSR
Vitamin A Deficiency	VAD
World Health Organization	WHO
Ultra Performance Liquid Chromatography	UPLC
Sequence Specific Amplification Polymorphism	SSAP
National Center For Biotechnology Information	NCBI
Diamine Tetra Acetate Ethylene	EDTA
Tris Borate EDTA	TBE
Lycopene <i>B</i> -Cyclase	<i>Lcyb</i>
<i>B</i> -Carotene Hydroxylase	<i>CrtZ-2</i>
Capsanthin - Capsorubin synthase	<i>CCs</i>
Isopentenyl Pyrophosphate	IPP
Dimethyl allylPyrophosphate	DMAPP

Geranyl pyrophosphate	GPP
Geranyl geranyl pyrophosphate	GGPP
Geranyl geranyl pyrophosphate synthase	GGPPS

## (الفصل الأول)

## 1. المقدمة Introduction

يعد الفلفل *Capsicum annum* L. مختلف أنواعه من الخضراوات عالية القيمة الغذائية، ومصدراً مهماً لفيتامينات A، C، وE وللعديد من المواد المضادة للأكسدة Antioxidant، وهو يستعمل كمنكه وملون طبيعي للطعام، فضلاً عن فوائده الطبية العديدة كمضاد للالتهابات Anti-inflammatory ومضاد للحساسية Anti-allergenic ومضاد للتسرطن Anti-carcinogenic، إذ تم إثبات إمكانية تقليل خطر السرطان باستعمال الفلفل الأحمر الناضج (Sitthiwong *et al.*, 2005 ; Kumari, 2013 ; Shaha *et al.*, 2013). يعود الفلفل للعائلة الباذنجانية Solanaceae ويضم 27-30 نوعاً معروفاً، خمسة منها فقط مدجنة Domesticated وهي *Capsicum annum*، *C. baccatum*، *C. pubescens*، *C. frutescens*، *C. chinense* (Andrews, 1984 ; da Costa *et al.*, 2006). يعتقد ان هذه الأنواع الخمسة المدجنة مشتقة من ثلاثة انساب وراثية متميزة وأن كل من *C. pubescens* و *C. baccatum* مشتقان من نسبين مستقلين، بينما الأصناف الأخرى *C. annum*، *C. chinense* و *C. frutescens* مشتقة من سلف قد يكون منحدراً من نوع مستقل او غير مستقل ويعتقد بأن اصل الفلفل منحدراً من اميرنا الجنوبية (Eshbaugh, 1993 ; Pickersgill, 1997). ان الفلفل *C. annum* يعد من اهم هذه الأنواع الخمسة ويضم النوع الحار (Hot) Pungent والنوع اليباد Sweet (mild). الفلفل الحار يحتوي على مركبات قلوية مسؤولة عن الطعم الحار وهي Capsaicinoids وهذه لها فوائد طبية عديدة وكذلك لها اهمية في الصناعات الدوائية يفتقد لها الفلفل الحلو ولكن هذا لا يمنع كونه مصدراً مهماً





(Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989) Isozyme وتحليل *al.*, 1999 ; Odeigah *et al.*, 1999)

*C. annuum* ن التغيرات في Isozyme قليل جداً (Belletti *et al.*, 1992)

*Capsicum* لذلك يستعمل تحليل Isozyme في برامج تربية الفلفل  
مثل هذه البرامج.

Amplified fragment length عديد

زيمات القاطعة عن طرق polymorphism (AFLP)

Polymerase chain reaction (PCR)

طقت لتحليل التنوع بين (Vos *et al.*, 1995)

ن هذه التقانة تظهر مستويات معنوية في الكشف عن تعدد الأشكال المظهرية للدنا DNA

Fingerprinting polymorphism

الخرائط الوراثية Gene Mapping ودراسات التباينات الوراثية Genetic diversity وكذلك من فوائد هذه

كبير

(Kafkas *et al.*, 2005). هذه التقانة قد في العديد من دراسات التنوع الوراثي في الفلفل

(Paran *et al.*, 1998 ; Ben-Chaim *et al.*, 2001 ; Lanteri *et al.*, 2003 ; Toquica *et al.*,

2003 ; Portis *et al.*, 2004 ; Geleta *et al.*, 2005 ; Aktas *et al.*, 2009 )

Restriction fragment length

فوائد عديدة في دراسات التباين الوراثي (Prince *et al.*, 1992). polymorphism (RFLP)

RFLP في كثير من دراسات التباين الوراثي في الفلفل (Prince *et al.*, 1992 ;

.Prince *et al.*, 1995 ; Kang *et al.*, 2001)

يجاد التباينات على مستوى Single Sequence Repeat (SSR)

(Rodrigues *et al.*, 1999 ; Ince *et al.*, 2010) مجدي

(Lee *et al.*, 2004 ; التباين الوراثي في ا SSR ؛ .al., 2010)

Kwon *et al.*, 2005 ; Minamiyama *et al.*, 2006 Nagy *et al.*, 2007 ; Haná ek *et al.*,

2009 ; Thul *et al.*, 2011 ; Nicolai *et al.*, 2012 ; Oh *et al.*, 2012) هذه التقنية

تعطي تبايناً عالياً، وكذلك تباينات للأليلات ذات السيادة المشتركة وللأليلات المتعددة (Becher *et al.*,

2000) Random amplified polymorphic DNA

(RAPD) في دراسة التباينات على مستوى الدنا ك من العلاقات التطورية بين النباتات التي تم

RAPD ؛ .(Rodrigues *et al.*, 1999 ; Ince *et al.*, 2010)

في مثل هذه الدراسات لعدة أسباب منها البساطة وختزال الوقت في ظهور النتائج والكلفة القليلة مقارنة

Radioactive ؛ (Bahurupe *et al.*, 2013) يتم

probes ولا يتطلب المعرفة المسبقة لتسلسل الدنا في تصميم البوادي Primers design، وكذلك يتطلب

كمية قليلة من قالب الـ DNA . RAPD ؛

(Sitthiwong *et al.*, 2005 ; da Costa *et al.*, Dendrogram ؛

.2006)

يمكن ل ن تساهم بالكميات اللازمة والموصى بها من الكاروتينات التي

ك و مصدر فيتامين A . بيتا-كاروتين -carotene-

*Capsicum spp.* يمكن أن يكون الحل لمحاربة نقص فيتامين A. الكاروتينات مسؤولة عن

(Guzman *et al.*, 2010). يوجد

34 من الكاروتينات غير Unesterified carotenoids

High performance liquid

chromotography (HPLC). هذه -carotene -cryptoxanthin

Zeaxanthin Violaxanthin Capsanthin Capsorubin (Deli *et al.*, 2001).

جينات عديدة في التصنيع الحياتي للكاروتينات التي تم كلونتها من بعض النباتات من ضمنها

الأرابيدوسيس Arabidopsis Tomato Pepper Deffadil

Marigold (DellaPenna and Pogson, 2006). يوجد في الفلفل جين مفرد سائد له علاقة

بالموقع الجيني y فيما بعد بأنه جين Capsanthin-capsorubin synthase gene (Ccs)

هذا الجين ينتج (Lefebvre *et al.*, 1998). عدة جينات ترميية ا

تتشارك في التصنيع الحياتي للكاروتينات Phytoene synthase gene (PSY) وهناك جينان منها في

له علاقة باللون وجين -Cyclase (Lcyb) Lycopene وجين -Carotene

Hydroxylase (CrtZ-2) وجين Capsanthin-Capsorubin Synthase (Ccs) (Guzman *et al.*,

2010).

ن هدف هذه الدراسة هو مكانية تحديد التعدد الشكلي Polymorphism لثمار الفلفل الحلو الكبيرة

Bell pepper وذلك عن طريق:

1. الجزئية مثل AFLP SSR RAPD في الكشف عن التباين الوراثي في العينات المدروسة.
2. Unweighted Pair Group = بين = .Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
3. الكاروتينات Carotenoids من ثمار الفلفل وقياس تراكيزها = High-performance liquid chromatography = = (HPLC)
4. = الجينات المسؤولة عن الكاروتينات -carotene hydroxylase .apsanthin-capsorubin synthase (*Ccs*) Lycopene -cyclase (*Lcyb*) (*Crtz-2*)
5. = الجينات اعلاه DNA sequencing = والاختلاف بينهم.

## ((الفصل الثاني))

## 2. استعراض المراجع Literature review

## 1-2: التنوع الوراثي في النباتات Genetic diversity in plants

يعد مقدار التنوع الوراثي للأنواع أساساً لبقائه وتكيفه في مختلف البيئات, وان تباين المادة الوراثية للسلاسل يعد واحداً من أهم المعايير لانتقلاء الآباء من أجل الحصول على صفات مرغوبة في النبات (Oh (1949) *et al.*, 2012 ; Dhaliwal *et al.*, 2014). ان مستوى التعدد الشكلي Polymorphism في المادة الوراثية النخية Elite germplasm يكون أحياناً محدوداً وغير كافٍ ليُسمح بالتمييز بين النمط الوراثي Genotype والضررب Variety (Geleta *et al.*, 2005). قد تطورت الجهود المبذولة لحماية المصادر الوراثية النباتية حديثاً عبر العالم وذلك لغرض مساعدة المزارعين في الاستجابة للتغيرات المناخية Climate changing (FAO, 2010). حماية النماط البرية Wild accessions هي غاية لمنع فقدان الأنماط الوراثية البرية عبر العالم (Nicolai *et al.*, 2013)، وأن تضييق القاعدة الوراثية للأنواع البرية ظهر عند تحويلها إلى أنواع مدجنة وكذلك عند استبدال السلالات الأصلية بالاصناف الحديثة Modern cultivars (Tanksley and Mc couch, 1997)، إذ ان هذه السلالات ذات تباين وراثي كبير ولها تكيفاً بيئياً افضل (Lanteri and Barcaccia, 2006).

في الوقت الحاضر هناك عدداً من الطرائق المستعملة في تقييم التنوع الوراثي (Zhang *et al.*,

2007) منها:-

1. الصفات المظهرية Morphological characteristics.
2. تحليلات علم الأنساب Analysis of genealogy.
3. المعلمات الكيميائية الحيوية Biochemical markers.
4. معلمات الدنا الوراثة الجزيئية Molecular DNA markers.

## 2-2: التنوع الوراثة في نبات الفلفل Genetic diversity in pepper plant

ان جنس الفلفل *Capsicum spp.* يضم العديد من الأنواع المختلفة في صفاتها، فقد قسم على ثلاثة مجاميع Complexes اعتماداً على دراسات الوراثة الخلوية Cytogenetic والتلقيح الخلطي Cross fertility، اذ تضم المجموعة الاولى *C. annuum* ثلاثة أنواع هي *C. annuum* ، *C. chinense* و *C. frutescens* وهذه الأنواع بالامكان تهجينها سوية ومع اقاربها البرية (Panda et al., 2004). وتضم المجموعة الثانية نوعان *C. baccatum* و *C. praetermissum* وتضم المجموعة الثالثة نوعان *C. pubescens* و *C. cardenasii* وهاتان المجموعتان معزولتان جنسياً عن بعضها البعض وعن المجموعة الأولى (Ince et al., 2010). ان الموطن الأصلي للفلفل هو امريكا الجنوبية وتحديدأ بوليفيا (Olmstead et al., 2008) واقدم دليل على وجود الفلفل المدجن وجد في كهف Tehuacan valley في وسط جنوب المكسيك South central Mexico قبل حوالي 5000-6000 سنة قبل الميلاد. يمكن تمييز الفلفل المدجن عن البري بالاختلافات الشكلية (Pickersgill, 2007 ; Perry et al., 2007). ان نوع الفلفل *C. annuum* قد دجن من الفلفل البري *C. annuum var. glabriusculum* في المكسيك (Perry et al., 2007 ; Kraft et al., 2014). ان الثمار البرية للفلفل التي تعد كسلف لثمار الفلفل

المدجن تكون صغيرة الحجم، منتصية، حمراء اللون، حارة الطعم، طرية وفضية، وعملية التدجين تغيرت هذه الصفات الى ثمار ذات حجم كبير حلوة المذاق بألوان متعددة وذات تغير شكلي كبير اعتماداً على رغبة الإنسان في مناطق التنوع المختلفة (Ortiz *et al.*, 2010 ; Paran and Knaap, 2007).

ان الأصناف التجارية الحديثة حلت محل الأصناف التقليدية حول العالم، لزيادة كفاءة التلقيح الذاتي والأزهار المبكر ومقاومة الآفات الزراعية وكل هذا أدى الى اختزال ضخم في التنوع الوراثي لهذا المحصول المهم اقتصادياً (Jung *et al.*, 2010 ; Paran and Knaap, 2007). هذا الانتقال يبينه بوضوح تحول نمط الفلفل الحار صغير الثمار للأصناف Anaheim/Ancho الى ثمار الفلفل الجرسى Bell pepper إذ ان دراسة الترييب وتحليل النسوء والتطور Phylogenetic analysis يشيران الى اختزال في تنوع الثمار ويبين أيضاً بان الفلفل الجرسى مشتق من سلف مشترك مع الأنواع Anaheim/Ancho (Hill *et al.*, 2013) وقد بين (Sanatombi *et al.*, 2010) أن التغيرات الوراثية للفلفل *C. annuum* أكثر من تغيرات أنواع *C. frutescens* و *C. chinense* اللذين يعدان شديدي القرابة لبعضهما البعض. ان زراعة كل من أنواع الفلفل *C. baccatum*، *C. chinense* و *C. frutescens* اقتصرت فقط على الحدائق المنزلية لمناطق مختلفة من الهند وليس على مستوى الانتاج العالي (Reddy *et al.*, 2014).

وضعت المواصفات الأساسية للتشخيص الدقيق للمادة الوراثية للفلفل من قبل International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) في روما، إذ وصف تسعة وسبعين صفة مظهرية

Phenotypic traits قسمت على خمسة وعشرين : Vegetative

زهار وكيفية تفتحها Inflorescence

والنوعية، وقد بينوا ان للثمار اشكالاً  $\Sigma$  Elongate والمستدير Alomost وغيرها Blocky Cam panulate Bell Triangular round (IPGRI, 1995). بالرغم من الدقة في تقدي ختلافات الوراثة بين النموات المختلفة للفلفل التي تبينها المظهرية والزراعية التي تميز كل نمو من النموات لاتزال مهمة  $\Sigma$  (Gon alves et al., 2008 ; Laurentin, 2009). اعتمد فيها (Sudré et al., 2010) المظهرية والزراعية لستة وخمسين نمواً من جنس الفلفل *Capsicum* spp. مجموعة من البرازيل ودرسوا اربع : إ ي صفة زراعية وقد تمكنوا من فصل *C. frutescens* *C. annuum* *C. chinense* ,*C. baccatum* الى مجاميع مختلفة مما يبين  $\Sigma$  كذا هذه الصفات لتوضيح التنوع الوراثي للنباتات, كما (Carvalho et al., 2014) وجود علاقة معنوية بين التشخيص المظهرية والجزئي وان الطريقتين  $\Sigma$  تين في تحديد وتصنيف انواع

### 3-2: التقانات الوراثة الجزيئية Genetic molecular techniques

ن دراسة التغيرات  $\Sigma$  : ط  $\Sigma$   $\Sigma$   $\Sigma$  يجاد الطرق الفعالة للحفاظ على المادة الوراثية Germplasm ن هذه الطريقة موضوعية وغير متأثرة بالبيئة مقارنة بدراسة الأ ط Phenotypes  $\Sigma$   $\Sigma$  ايز Genetic differentiation وتوثيق التغيرات بين  $\Sigma$  المحاصي (Powell et al., 1996 ; Rodriguez et al., 1999 ; Geleta et al, 2005 ; Lai et al., 2010 ; Oh et al., 2012)



- Plant breeders  
 برامج تحسين المحاصيل المختلفة (Tam *et al.*, 2005 ;  
 العديد من .Yüzbaïodlu *et al.*, 2006)  
 في تصنيف الأ  
*Capsicum annuum* L.  
 Solanaceae التي تضم محاصيل خرن مثل الطماطا والبطاطا والتبغ  
 (Pickersgill, 1997 ; Dias *et al.*, 2003 ; Kumar and Rai, 2005).  
 2n=24 مع قليل من الا  
*Capsicum compylopodium* 2n=26  
 كثر المحاصيل تنوعاً (Moscone *et al.*, 1993)  
 (Thul *et al.*, 2011 ; Oh *et al.*, 2011 ; Hill *et al.*, 2013).  
 العديد من الجزئية لغرض تصنيف الأنواع النباتية المختلفة وم  
 -: *Capsicum*  
 1. عديد  
 Amplified fragment length polymorphism  
 (Paran *et al.*, 1998 ; Kang *et al.*, 2001 ; Toquica *et al.*, 2003 ;  
 Lanteri *et al.*, 2003 ; Geleta *et al.*, 2005 ; Aktas *et al.*, 2009)  
 2.  
 Restriction fragment length polymorphism  
 (Lefebvre *et al.*, 1993 ; Kang *et al.*, 2001) (RFLP)

(Lee *et al.*, 2004 ; Kwon *et al.* Single Sequence Repeat (SSR) .3

*al.*, 2005 ; Minamiyama *et al.*, 2006 ; Portis *et al.*, 2007 ; Stigel *et al.*, 2009 ;  
. Pacheco-Olvera *et al.*, 2012)

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) .4

(Paran *et al.*, 1998 ; Rodriguez *et al.*, 1999 ; Lanteri *et al.*, 2003 ; Adetula,  
.2006 ; Oyama *et al.*, 2006)

### 2-3-1: التنوع الوراثي باستعمال تقانة AFLP

Keygene N. V., Wageningen Netherlands AFLP

Selective fragment amplification (SRFA) (Vos *et al.*, 1995)

Selective (Zabeau and vos, 1993)

Restriction enzymes هذه amplification

High بصورة واسعة في بناء الخرائط الوراثية الحاوية على

Population genetics في دراسات الوراثة السكانية densities of DNA marker loci

DNA Plant breeding تربية النبات Molecular evolution

Forensic sciences هذه fingerprinting

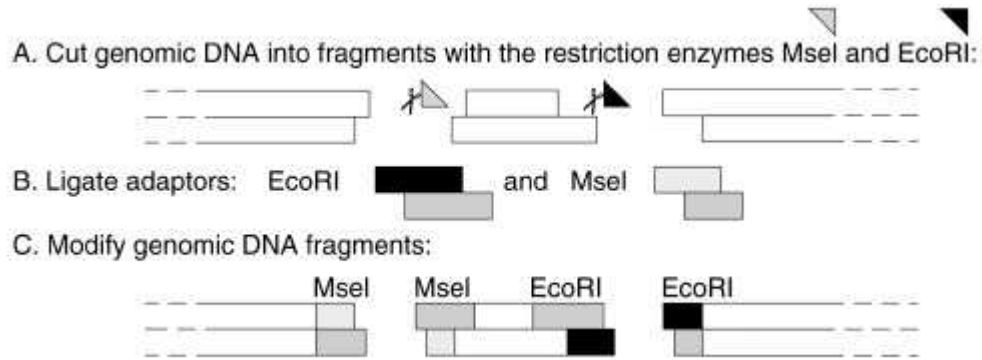
Accessions عدة تطبيقات مع النباتات منها تحديد التنوع الوراثي ضمن

(Saunders *et al.*, Indistinct traits الصفات غير الواضحة و المتشابهة و

(Vos *et al.*, 1995 ; (Hayashi *et al.*, 2005 ; 2001. تتضمن هذه  
Applied Biosystems, 2010) -:

1. يستعمل نوعين من الأنزيمات القاطعة هما EcoRI MesI  
سبيل المثال لغرض الحصول على قطع عديدة من هذا الدنا.

2. ربط القطع المتحصل عليها في الخطوة الأولى Adapters التي هي عبارة عن شرط  
من نيكلويتيدات قليلة Oligonucleotide  
القاطعة ونهايات الوصلة المهمة (1-2).

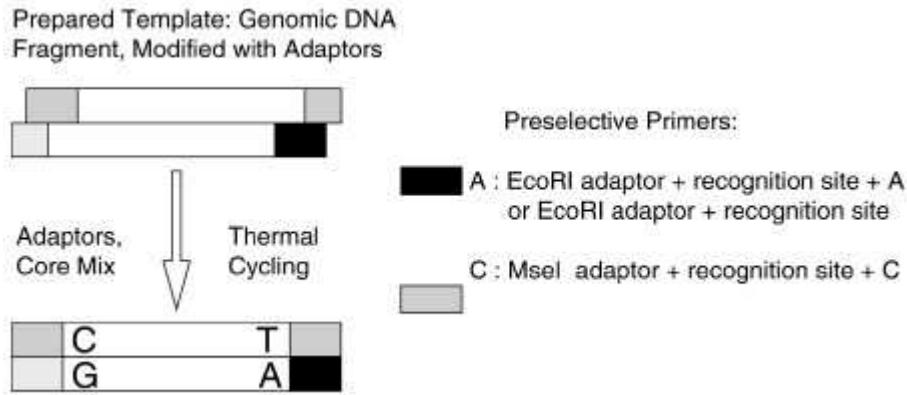


ك (1-2): تحضير القالب وربط الوصلة المهمة

(Applied Biosystems, 2005)

3. النيكلويتيدي رتباط البوادي ويتم تضخيم هذه القطع  
PCR Forward وعكسية Reverse وتسمى هذه الخطوة  
بالتضخيم قبل Preselective amplification. MesI

النيكوتيدية C 3' ، بينما 3' ، EcoR1 على القاعدة النيكوتيدية A  
 حاوية على الوصلة المهيأ .3' .  
 مكملة للبادئ المستعملة تضخم  
 PCR (2-2).

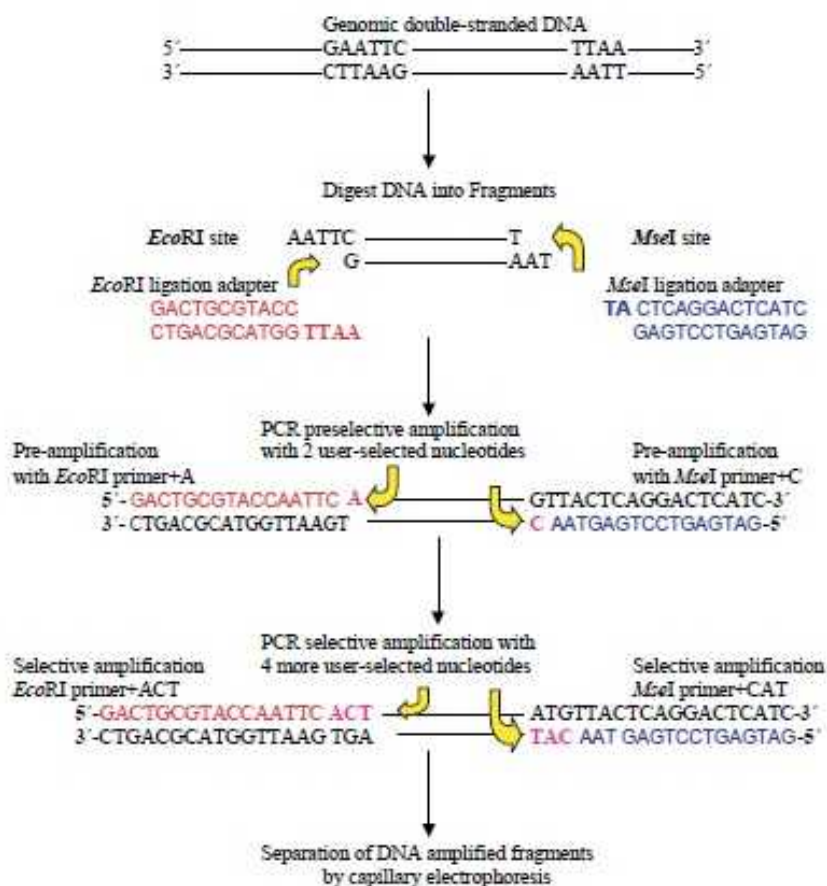


Preselective amplification (2-2):

(Applied Biosystems, 2005)

4. EcoR1 MesI .  
 نهايتهما على ثلاث قواعد نيكوتيدية EcoR1 يادى يكون معلم بصيغة تألقية ، Fluorescent  
 5' dye-labeled primer PCR .  
 Selective EcoR1/MesI-ended fragments وتسمى هذه العملية بالتضخم الا  
 amplification. القطع التي تكون حاوية على نهايات EcoR1/EcoR1 تضخم بشكل جيد،  
 بينما القطع التي تكون حاوية على نهايات MesI/MesI يمكن مشاهدتها لأنها لا  
 تضخم بشكل جيد.

نيكوتيدات، بين 50-100 ك (2-3) يوضح تقانة AFLP بشكل



Amplified fragment = عديد (2-3): ك (3-2) length polymorphism (AFLP) (Saunders *et al.*, 2001)

AFLP يمكن يك ي ك =  
 الحقيقية النواة ك حيوان وكمية صغيرة مذ ك = ك =  
 مسيقة بالتسلسلات النيوكليوتيدية المستعمل في هذه التقنية (Vos et al., 1995).  
 AFLP -: =

1. كلة كبيرة عند تطبيق هذه التقنية = =  
 ( نواع غير المدجنة (Non-domesticated) ك الفطريات يسبب المواد الكيميائية النباتية  
 Phytochemical والسكريات المتعددة ذات الوزن الجزيئي العالي Polysaccharides.  
 2. ن يتم بصورة تامة لضمان سلامة الخطوات اللاحقة.

3. كمية مكونات تفاعل PCR MgCl<sub>2</sub> dNTPs DNA polymerase  
 ن هناك علاقة عكسية بين تركيز dNTPs = =

لاحظ هياشي وجماعته (Hayashi et al., 2005) ين تركيز 0.5-0.4 dNTPs  
 قل من التراكيز 0.1 0.2 0.3 =  
 تغير

تراكيز العالية من dNTPs ومن هذا يتضح = : dNTPs يكون التغير =

AFLP = =  
 (Vos et al., 1995) = =  
 P33 P32 = =

Denaturing polyacrylamide gel كرامايد

Autoradiography films بتقانة تحليل صور الفسفور  
 .Phosphor-image analysis

ر المشعة خطر على الصحة ومكلف مادياً ويتطلب مهارة وتقنية  
 عاليتين (Krap et al., 1996) AFLP ويستعاض عنه بالتصبيغ بصيغة  
 (Chalhoub et al., 1997).

AFLP في تسهيل التخطيط لنتخاب توافقات جينية لرفع نسبة تطوير خطوط  
 (Ellis et al., 1997) نتاجية هذه الطريقة حساسيته للتغيرات والتباين  
 (Lin et al., 1996)

AFLP RAPD RFLP AFLP تحديد التغيرات الوراثي لنبات فول الصويا,  
 (Paran et al., 10-8 التقانين خريتين تميزية ذات تعدد شكلي  
 1998) الى العلاقة الوراثية بين 34 *Capsicum annuum*

AFLP RAPD التقانين نتائج التعدد الشكلي للعينات  
 AFLP RAPD 1.6 6.5 AFLP ه

الباحث فعالية AFLP RAPD على تمييز Blocky  
 AFLP كافيين للتمييز الدقيق بين هذه بادئين فقط

(Kochieva and Ryzhova, 2003) ي = AFLP للتمييز = بين 14 لفلل وكانت نسبة التعدد الشكلي الناتجة هي 16.5% = = تقدير البعد الوراثي لـ 39 =

ط = ثيوبية = نميت في البيت الزجاجي لجامعة Free state, South Africa .

هذه البادئات 352 يتراوح حجمها بين 398-40 بين 50-63 = =

ك = ق = ي = كان البعد الوراثي بين ط = يشير لى تغاير وراثي عال = ك = ثيوبي الطويل الذي كان قليلاً =

ط = يبين التغاير الوراثي = Accessions = (Tam *et al.*, = شكلي = 2005). = (Geleta *et al.*, 2005) = 8.03% =

35 = AFLP وهذه النسبة تعد واطئة مقارنة بالنسب = =

14 = =

تراكيب = = AFLP = =

215 = ط 26% = ك = Breeding lines = ط =

Alata agricultural Research institution = Similar cluster =

نتيجة لا = = ية الضيقة وعمليات الا = ي =

الوراثي ضمن المجموعة السكانية ك = = الرقيق, = =

ط = خرن الطبيعية المحلية التريمية فكانت ذات تنوع جيني عال (Aktas *et al.*, 2009).



Chili لتعيين التباير الوراثي للفلل الحار (Krishnamurthy *et al.*, 2012)

تايوان هجين من الفل و AFLP 150

### 2-3-2: التنوع الوراثي باستعمال تقانة SSR

Microsatellites SSR

Cultivated species

Mapping تحديد خرائط الصفات الكمية Low polymorphism

Marker assisted selection quantitative traits

اليسيط SSR (Varshney *et al.*, 2005 ; Dhaliwal *et al.*, 2014)

50-5 DNA قصيرة 5-2

Genetic مفيدة جداً هذه (Turnpenney and Ellard, 2005)

analysis الحيوان وذلك لتبايرها وتنوعها العالي وسهولة تقصيرها

Multi allelic ليلية متعددة Polymerase chain reaction (PCR)

Reproducible وذات سيادة مشتركة Co-dominant forms

(Litt and Luty, 1989 ; Edwards *et al.*, 1991 ; Jacob *et al.*, 1991 ; Powell *et al.*, 1996 ; Weising *et al.*, 2005 ; Soni *et al.*, 2010)

مجينات

Genomics حقيقية النواة ومنتشرة في جيد , ك بين SSR بين  
 (Tam et al., 2005 ; Mimura et al., 2012). ط

SSRs Capsicum spp. يوكليوتيدات قصيرة Oligonucleotides  
 Probes (TTG)10 (ATT)10 ,(GT)15 ,(GA)15 ,(AT)15 ك

جينات الجينية Genomic libraries وقاعدة بيانات بنك الجينات Base ك  
 ,gene bank data (GA)15 (GT)15 ك يذ الفلفل تليها  
 (AT)15 (TTG)10 36 SSR ك  
 المكتبات الجينية Polymorphism information contents مقدار مرتين ك  
 الجينات (Lee et al., 2004). ك

تغاير SSR Crop research Institute, ك  
 Prague-Ruzyne , Department of vegetables and special crops in Olomouc ك

Accession 41 (ليل) Uniform spectra ك  
 (ط) عينات من هذه Hpms 1-1 Hpms 1-168 ك  
 Hpms 1-274 8-2 28 ك  
 ط 3.5 ك . بينت الخارطة الوراثة المبنية على نتائج هذه الدراسة تشابهاً عالياً بين  
 Accessions (Hanacek et al., 2009) ك  
 (Rodrigues and Tam, 2010) ك SSR ك

*Capsicum frutescens* المزروعة في ماليزيا. ات جزئية متعددة

تحديد مستويات التنوع ضمن المجموعة قيد الدراسة

Heterozygotes غير المتماثلة : مما يشير

Inbreeding فيما بينها ن تقدير

التغاير

المزارعين التقليديين على البذور من نتائج محاصيلهم وقد بين (Ince et al., 2010)

45 SSR

الباذنجان والتبغ , *Capsicum annum* ضخمت مجين كل من:

*C. pebescens* *C. grutescen.* *C. chinense* *C. baccatum* *C. chacoense*

يشير هذه *Capsicum* الينوكليوتيدات

Intraspecific يكون بتكرارات ثلاثية النيوكليوتيدات

( Oh et al., 2012 ) يمكن SSR

وتحديد التغاير 22 SSR

61 Accessions 82

بين Chili pepper

SSR 64

27 55 75 2.78 ليل

(Dhaliwal et al., 2014)

## 3-3-2: التنوع الوراثي باستعمال تقانة RAPD

تحليل التعدد الشكلي RAPD  
 من خلال تضخيم قطع دنا عشوائية  
 من النيوكليوتيدات  
 و غياب حزمة واحدة من ناتج تضخيم هذه  
 ثير التغيرات البيئي.  
 رتباط يادى في المجين المستهدف وذلك يالا  
 لسبب الرئيس لنجاح هذه التقانة هو تطوير عدد كبير من  
 (PCR).  
 قت قصير ولا تتطلب معدات معقدة لا  
 لي كمية قليلة من الدنا المجيني  
 للنوع قيد الدراسة (Williams *et al.*, 1990; Sitthiwong *et al.*, 2005 ; da-costa *et al.*,2006;  
 Cheema and pant, 2013; Sikora and Nowaczyk, 2014 ).  
 (Williams *et al.*, 1990 ) دنا مجيني م  
 يغياب المعلومات عن تسلسلات النيوكليوتيدات لهذه الأ  
 10-9 قاعدة ونسبة  
 %80-50 G+C ك جرت هذه ي مع دنا بكتريا *E. coli*  
 قطع دنا المجين الصغير للبكتريا الذي هو بحجم  $4 \times 10^3$  ي كل يادى  
 المجين يمكن تميز الأليلية Allelism ي RAPD ي يمكن التفريق بين  
 غير متماثلة Heterozygote ي Homozygote  
 RAPDs ي Dominant ويسبب بساطة وسرعة هذه

(Williams *et al.*, 1990 ; Kumar

و

: and Gurusubramanian, 2011)

1. Genetic mapping

2. الجزئية المرتبطة

3. الوراثة السكانية والتطورية Population and evolutionary genetics

4. تربية النباتات والحيوانات Plant and animal breeding

1 RAPD تقديرات ر دقة بين المجموعات السكانية الأ

(Williams *et al.*, 1990 ; Williams and Clair, ي لمجموعات السكانية بعيدة القرابة

ة من هذه التقانة .1993 ; Smith and Williams, 1994)

Phylogenetic وساندت بصورة عامة التصنيف الحالي المبني على دراسة المظهر

بين الأ Morphology Isozymes RFLPS

نات النسيجية Clonal RAPD

organisms .(Williams *et al.*, 1990)

ان هذه التقانة ستعملت بنجاح في دراسة جميع الكائنات ومنها نبات الفلفل *C. annuum*

(Prince *et al.*, 1995) تم قياس التغيرات الوراثية بين

المستقاة من تحليتي RAPD Southern blot analyses

رسمت بين 21 Accession *C. frutescens* *C. annuum*

Accession *C. chacoense* *C. chinense* *C. baccatum*

*C. baccatum* *C. frutescens* *C. annuum*  
 Accession  
 Accessions  
 والتي تكون مفيدة في دراسات التصنيف  
 ميزت بهذه  
 في هذه الدراسة يشير  
 جيد من  
 (Paran *et al.*, 1998)  
 21  
 RAPD لتمييز عدة  
 هذه الابدئات لم تتمكن من تمييز  
 الثمار الكبيرة Jupiter  
 قل تغيراً  
 خرق قيد الدراسة  
 Accessions 134  
 Asian vegetable Research and development center  
 RAPD 110  
 تحليل التباين  
 بين Accessions  
 تختلف عن التصنيف السابق للأ  
 Accessions  
 ميزت  
 RAPDs  
 بين Accessions  
 (Rodreguiz *et al.*, 1999)  
 (Baral and Bosland, 2002)  
 النيبالي الحار Chili  
 معرفة التباين الوراثي  
 RAPDs وقارنها بمحاصيل  
*C. annuum var. annuum*  
 المتحصل عليها  
 النيبالي *C. annuum var. annuum*  
 دليل التشابه Similarity  
 index 0.80 بينما Accessions  
 ما يشير  
 التباين الوراثي العالي بين ,  
 كيد على ن تحليل RAPDs له القدرة على تحديد وتقصي الفروقات

- Open Species level. عند دراسة التغيرات الوراثية بين تراكيب مفتوحة التلقيح
- California wonder Bell pepper pollinated
- Jupiter هو صنف حديث , RAPD على للتغيرات الوراثية
- كان بين نموات California wonder Accessions .Accessions قيد الدراسة كان 23
- 28 RAPD 357
- شكلي حصل عليها من نسبة التشابه الوراثي 0.86
- California wonder
- Accession .(Votava and Bosland, 2002) Jupiter
- 12 RAPD (Sitthiwong *et al.*, 2005)
- Accessions من الفلفل التايلندي قيم تشابه بين نطاق الوراثة المدروسة تراوحت بين 0.891-0.209
- Accessions إلى مجموعتين ساسيتين
- Accessions وهذه بدورها إلى مجموعتين ثانويتين
- عند تقييم التنوع الوراثي لسبعين Accessions كيد تشخيصه
- RAPD ضمن وبين الأ
- Interspecific and Intra specific مع التصنيف المظهر وذلك
- Accessions 53 C. annuum 16 C. chinense 16 C. baccatum 14 C. 7
- 60 Oyama *et al.*, 2006 .(da- Costa *et al.*, 2006) *frutescens*

دراسة مستون التغير الوراثي لخمسة عشر تجمعاً	166	نتجت هذه الپادئات	126	RAPD
وكانت نسبة متوسط التعدد الشكلي	125			
ومتوسط التغير الوراثي الكلي تراوح بين		%34.7	%34.2	
		0.131-0.81	0.165-0.069	
	التغير		0.254	
سبع منها كانت ذات	500	Chili		
Differential marker	تمييز	Specific primer		
		(Makari et al., 2009)	التغير الوراثي لهذه الأ	
2760	11	العلاقات الوراثية بين 24 Accessions		
Unweighted Pair	Touch-down PCR (Td-PCR)	RAPD		
Accessions	Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)			
C. chacoense	C. baccatum	C. pubescens	C. annuum	
بين نموات	Genetic similarity index	بين 0.082 + 0.487	على تغير	
	(Ince et al., 2010)	C. baccatum	C. pubescens	قل مستون من التغير ظهر في
Landraces		(Sanatombi et al., 2010)	بين	
C. frutescens	C. annuum		Manipur	



*chinense* وبعد تحليل نتائج RAPD *C. annuum* UPGMA *C. chinense* *C. frutescens* مجموعتين رئيسيتين

التغاير الوراثي بين الأ *C. frutescens* *C. chinense annuum* أكثر من التغاير بين الأ بينهم.

*C. annuum* Accessions 22

*C. luteum C. eximium C. chinense C. baccatum frutescens*

RAPD ISSR

هذه Accessions 27 RAPD 8 ISSR

*C. annuum* Accessions 23-88% 11-96%

بتحليل UPGMA *C. chinense C. luteum* بينما

*C. frutescens* وراثياً ومظهراً *C. baccatum* (Thul et al., 2011).

التغاير الوراثي لـ 23 Chili 13 RAPD

حجمها ما بين الحزم الناتجة من هذه البادئات 63

2754-391 35 حزمة وحيدة الشكل Monomorphic 28

44.4% لكل بادئ بين 5-9 7

بين 0.42-0.97 تغاير بين الأنماط الوراثية لـ

Chili ظهرت وجود ثلاثة مجاميع رئيسية 13

(Bahurupe et al., 2013). بينت

صناف المدروسة ذات تباين وراثي ملاحظ (Cheema and Pant, 2013)

وهذا التباين ظهر على مستوى الصنف لذلك يمكن تصنيف الأنماط الوراثية. رئيسية مما يشير هذه الطريقة مع دراس

77.77%  
 13 Paprika Chili  
 .SSR RAPD 12  
 5.41 RAPD 65 78  
 22-3 Loci 28 SSR بينما يادئات  
 0.9-0.117 RAPD Similarity index تراوح بين 0.91-0.36  
 RAPD الشجرة الوراثية الناتجة من تحليتي 0.62 0.39 SSR  
 نماط المدروسة ذات الثمار الصغيرة عن الثمار المتوسطة الكبيرة المعلمي ظهرا تبايناً  
 (Tilahun et al., 2013) تقدير التباين

Commercial chili (Prasad et al., 2013) التباين

Andhra Pradesh state في الهند وتحديداً  
 Monomorphic الشكل وحيدة OPABO2 RAPD

Sindura Black Dimond Gemini G-334 نماط الوراثية بينما ا

جرة القرابة حسب نتائج هذا الجادى و

- Similarity index ط دليل التشابه %50 First cluster %100 %32
- (Rana *et al.*, 2014) التغيرات والعلاقات الوراثية لـ 24
- ISSR RAPD, ن مستوى التعدد الشكلي كان بين %42
- Kandaghat Feroz PC-1 ط على تشابه بين الأ ISSR %44 RAPD
- %93 Kandahat Feroz Selection-9 ط %96 Selection-9 Gajio
- Mahog Acc-2 بين النمطين ISSR RAPD
- بوجود تزواج هذين النمطين لخلق تجمعات سكانية منفصلة
- التغيرات الوراثية. (Sikora and Nowaczyk, 2014) تشخيص الهجن بين الأ
- RAPD Inter specific hybrids
- (*C. frutescens* X *C. baccatum*) (*Capsicum annuum* X *C. frutescens*)
- 15 , *frutescens* X *C. chinense*)
- بين 2127-122 ط 7-3 .
- 143 111 يادئين ين
- RAPD للهجين (*C. frutescens* X *C. annuum*) يادئين للهجين (*C. frutescens* X *C. baccatum*) للهجين (*C. frutescens* X *C. chinense*) ن شجرة القرابة وقيم البعد

من خلال تحليل نتائج RAPD قربة بين *C. annuum* و *C. frutescens chinense* تغاير

## 4-2: الكاروتينات في الفلفل Carotenes in pepper

الكاروتينات هي مركبات يـزويـرنودية Isoprenoids رعين ذرة كارون الأيزوبرين Isoprene - Head-Tail مع ترميمات حلقة من ي و كلا النهايتين (Deli et al., 2001 ; Naik et al., 2003 ; Delgado-Vargas and peredes-Lopez, 2003).

الكاروتينات كبر المجاميع الصيغية النباتية Plant pigments و بعض البكتريا الزرقاء Cyanobacteria والكائنات الدقيقة غير المصنعة للضوء-Nonphoto Micro organism وبعض البكتريا (Gomez-carcia and Ochoa-Alejo, 2013 ; Hirschberg et al., 1997). تتجمع الكاروتينات في البلاستيدات الملونة Chromoplasts

Chromophore يحدد طي متصاص لجزئية الكاروتين وهو يعطي اللون الذي تراه العين (Weedon and Moss, 1995). تعد الكاروتينات صبغات محبة للدهون Lipophilic زهار والفواكه والخضار فتعمل كجاذبات للملقحات Pollinators

الحشرات والحيوانات الأخرى التي تعد ك Seed dispersal (Fraser et al., 1994 ; Bartley and Scolnik, 1995 ; Hadden et al., 1999 ; Deli et al., 2001 ; Naik et al., 2003 ; Kato et al., 2004 ; Jordan, 2006 ; Skelton et al., 2006 ; Zhu et al., 2009)

الكاروتينات صبغات مساعدة Light harvesting accessory

Harmful reactive oxygen species وكسجين الفعال  
 والذي ي Over excitation للكورفيل وتساعد في منع بيروكسيد الدهون Lipid  
 peroxidation كذلك تعد كبادى لحامض الأيسيك Absciscic acid ي ي Plant  
 (Havaux, 1998 ; Niyogi, 1999 ; Naik *et al.*, 2003 ; Ha *et al.*, 2007 growth regulator  
 ; Zhu *et al.*, 2009) .; كذلك تحمي الخلايا والعضيات من ضرر التأكسد  
 وكسجين المفردة وكسح الجذور الحرة المسببة للأ (Camara *et al.*, 1995 ; Paiva and  
 Russell, 1999 ; Hornero-Mendez *et al.*, 2000 ; Hirschberg, 2001; MaoKa *et al.*,  
 2001; Vonlintig and Vogt, 2004 ; Guzman *et al.*, 2010 ; Nadeem *et al.*, 2011 ;  
 .Abdul Rahim and Mat, 2012) ندة الكاروتينات في تقليل  
 , عتمام عدسة العين , Cataract , السكر ,  
 (Kaur and Kapoor, 2001 ; Naik *et al.*, 2003 ; Stahl and Sies,  
 2003; Li and VanEck, 2007 ; Matsufuji *et al.*, 2007 ; Gorinstein *et al.*, 2009 ;  
 .Hervert-Hernandez *et al.*, 2010; Shotorbani *et al.*, 2013) يمكن  
 فيتامين A ي يزوبرنويد الداخلية Endogenous isoprenoid precursor ي  
 الكاروتينات النباتية في تجهيز مصدر فيتامين A ي لرتينويدات Retinoids  
 البيتاكاروتين ونقصه يسبب تتراوح بين العشو الليلي Night blindness  
 العين Xerophthalmia وتلين القرنية Keratomalacia ( Naik *et al.*, 2003  
 .Stahl and Sies, 2003; Sharoni *et al.*, 2012) (WHO) ي 250  
 مليون طفل في سن ما قبل المدرسة يعاني من نقص فيتامين A (VAD) 500 -250

هم يموت خلال سنة من فقدان بصرهم. على قلب البيتاكاروتين  
 البيتاكاروتين ويمكن يك الحل لمكافحة نقص هذا الفيتامين  
 Provitamin A لي فيتامين A : Mono-oxygemase نزم معوي يحول كل  
 من البيتاكاروتين الى 1 يك فيتامين A ي Retinol  
 (Taylor and Ramsay, 2005). نماط ومستويات الكاروتينات تختلف بين الثمار وتتأثر بالعوامل  
 البيئية (Gomez-Carcia and Ochoa-Alejo, 2013).

(Lang et al., 2004)

Capsanthin -carotene لاحظ ين البيتاكاروتين موجود في الثمار الحمراء والبرتقالية بينما  
 Capsanthin ط. ن الفلفل يتحول من اللون الأ  
 خيراً .  
 محتون المغذيات النباتية Phytonutrients

*Capsicum annuum cv. vergasa*  
 خضر غير الناضج Immature green حمر غير الناضج  
 كسدة كالفينولات وفيتامين C والكاروتينات ك ط خضر غير الناضج  
 متلك مكونات فينولية عالية بينما الأ ط كانت النسبة فيه  
 زدادت كمية فيتامين C الكاروتينات. الليوتين  
 خضر غير الناضج بينما البيتاكاروتين هو الغالب في الفل  
 Neoxanthin Cislutein

ي كاروتينات خضر الناضج وغير الناضج والأحمر غير الناضج، ويوصل الفلفل  
 مر الغامق ظهرت صبغات كاروتينية Cis-capsanthin Capsorubin  
 الكاروتين الكلية Total (Marin *et al.*, 2004 ; Ha *et al.*, 2007) Cis-zeaxanthin  
 carotein Provitamin A نتيجة تواجد البيتاكاروتين -crytoxanthin (Marin *et al.*, 2004).  
 (Hallmann and Rembialkowska, 2008) فيها تأثير التجميد محتو فيتامين C  
 Total flavonols والكاروتينات والفلافونويدات الكلية بأن فيتامين C والليوتين  
 عينات الفلفل الطازج من عينات الفلفل المجمد -20 °، ن التجميد قلل من المرينات  
 الفعالة حيويًا Bioactive compounds Roberta Ozarowska  
 وهذه النتيجة المتحصل عليها من قبل (Rambialkowska *et al.*, 2003) التي بينت  
 Flavonoids Vitamin C Lutein -carotene ن تريب الكاروتينات  
 HPLC نتاج مسحوق البابركا Aleva NK  
 خفضت فيه نسبة الكاروتينات الحرة والمؤسترة Free and esterified  
 carotenoids ن عملية التجفيف والطحن تؤدي انخفاض الكاروتينات في البابركا، بينما ظهرت  
 زيادة في نسبة الكاروتينات الأحادية والثنائية الأستر Mono and diesterified carotenoids  
 Capsanthin انخفاض في الكاروتينات الصفراء (Kevresan *et al.*, 2009). (Guzman *et al.*, 2010)  
 العلاقة بين لون الثمار و بيتاكاروتين جهاز Ultra Performance Liquid

Chromatography (UPLC)

ما من تراكم البيتاكاروتين تراكم الكاروتينات الحمراء والصفراء

Capsanthin Capsorubin همة في الصناعة كملونات طبيعية لمواد

التجميل والمنتجات الغذائية (Guzman et al., 2010 ; Nadeem et al., 2011). بين (Nadeem et al., 2011)

نسبة البيتاكاروتين Torkel Mazurka

حمر هو نتيجة عدة صيغات كاروتينية منها Capsanthin

Capsanthin Zeaxanthin Cryptoxanthin Capsorubin % 60-30

من مجمل كاروتينات ثمرة الفلفل وصيغة Capsorubin كصيغة شبيهة %18-6

حمر يرجع لكمية هاتين الصيغتين الخاصة بجنس الفلفل *Capsicum*.

Total carotenoids الكلية

قل وهذا يختلف عن نتيجة (Sun et al.,

2007) والذي من البيتاكاروتين في الفلفل الأ Green and

(Blanco –Rios et al., 2013) Red Bell pepper.

الكاروتينات حسب مرحلة التطور ن الليوتين Lutein و الكاروتين السائد في الفلفل

ثم ينخفض بتقدم مرحلة بينما Capsanthin

مستوى قليل في المراحل المبكرة من النضج ثم يزداد تدريجياً

البيتاكاروتين كان المك

نتيجة لتراكم الألفا والبيتاكاروتين Zeaxanthin Lutein cryptoxanthin-



- نتيجة تراكم Capsorubin Capsanthin 5-6 epoxide (Gomez-carcia and Ochoa-Alejo, 2013). Chavez-Mendoza *et al.*, 2013) بيذ فيها
- Grafting Bell pepper كسدة وفيتامين C يكوين والبيتا كاروتين وذلك عند
- Jeanette Fascinato Terrane ختلافات في محتون هذه المركبات الحيوية بين الأ
- المطعمة وغير المطعمة, ذ كان فيتامين C يتاكاروتين والفعالية المضادة للأ
- Fascinato Jeanette ولم يكن هناك ي ثير للتطعيم
- الفينولات الكلية واللايكوين Lycopene. نبات الفعالة حيويًا Bioactive compounds
- C. a. var. Capsicum annuum L.var. frutescens* و *C. a. var. Glabriusculum* *C. a. var.*
- Bellpepper* على من الكاروتينات,
- var. Bellpepper* ( ) كاروتينات *C. a. var.*
- C. a. var. frutescens Glabriusculum* (Shaha *et al.*, 2013).

## 2-4-1: الجينات المسؤولة عن تصنيع الكاروتينات

الفلفل من بين الأنواع المختلفة للمحاصيل  
تصنيع الكاروتينات التي  
سجي الغامق عند النضج وهذا يرجع  
تغاير تريب الكاروتينات, لهذا يعد الفلفل نظاماً جيداً  
(Ha et al., 2007).  
مختلف الكائنات كالبكتريا الزرقاء  
نبات الأرابيدوسيس Arabidopsis  
Marigold. ن خطوات مسلك التصنيع الحيوي  
للكاروتينات قد عرفت التحليلات الكيموحيوية  
Labeled precursors  
Specific inhibitors  
Characterization of mutants  
(Hurtado- (Hirschberg et al., 1997 ; Dellapenna and Pogson, 2006)  
Hernandez and smith, 1985) دراسة ضرب فيها  
وكان ناتج الجيل الأ  
مواقع جينية مستقلة y  
c1 c2. ن العلاقة بين وجود الجينات الترميمية Structural genes لتصنيع الحيوي  
للكاروتينات وتغاير ط  
Genetic approaches (Guzman et al., 2010)  
C. 3 Capsicum annuum 24 28  
C. frutescens chinense العلاقة بين لون الثمار ومحتوى البيتاكاروتين

ك تحليل النيكوتيدي رعة جينات ترثيية Structural biosynthetic genes  
 تحديد الفروقات الأيضية والجينية بينهم. = =  
 Pericarp كانت بيتاكاروتين وكاسانثين Capsanthin وكابسوربين Capsorubin وقد ظهر تغير  
 بدرجة كبيرة بين هذه الكاروتينات ونسبة الكاروتين الكلي =  
 حدد بوجود البيتاكاروتين وك ط لكاروتينات الحمراء والصفراء ومن الجينات  
 التي لها علاقة بالتصنيع الحياتي للكاروتينات هي:

1. جين *Psy*: هو الجين : Phytoene synthase = 4

يحسب ما بينه (Thorup et al., 2000). ن هذا الجين هو المرشح تحديد اللون البرتقالي

نتاج الفايثوين ذ رعين = ك

جين الخطوة المحددة لتصنيع الكاروتينات (Huh et al., 2001) , (Lang ,

2004) RT-PCR الخاصة بتعبير الجين *Psy* اتج هذا الجين وجدت في

= نه ليس العامل المحدد الرئيسي للونين الأ

بينما وجد (Kim et al., 2010) = الرط (بين الأنترون والأكسون) Splicing

mutation لهذا الجين بين *Capsicum chinense*.

(Guzman et al., 2010) = هذا الجين يشترك مع موقع C2 = =

(Hurtado-Hernandez and smith, 1985)

Promoters هذا الجين ولدت قطعة بحجم 2849 وتضمن الجين خمسة

كسونات والبروتين المتوقع ك 420 مين.

2. جين *Lcy-B*: وهو الجين cyclase - ذ يضيف حلقتين البيتاكاروتين وهو موجود على الجين ضخمت قطعة بحجم 1495 نترات والبروتين الناتج مكون من 499 ميني (Guzman *et al.*, 2010). ن هذا الجين عزل من غشية البلاستيدات الملون (Camara and Dogbo, 1986) Cyclization للايكوين ليحوله بيتاكاروتين (Huguene *et al.*, 1995) عبير هذا الجين كان ظاهراً في الأ الفتية والمسنة (القديمة) للفلل وتعبيره كا (Gomez –Garcia and Ochoa-Alejo, 2013).
3. جين *BcH* او *CRTZ-2*: هذا الجين وجد على 3 (Thorup *et al.*, 2000) وقد تبين ان يادى هذا الجين 2150 نترات والبروتين المتوقع مكون من 316 ميني. 2026 (Guzman *et al.*, 2010) جروا فيه لتسلسلات الدنا المجيني -Carotene hydroxylase : هذا الجين مسؤولاً Cyp 97A : Zeaxanthin -carotene (Gomez-Garcia and Ochoa-Alejo, 2013)

## 2-4-2: المسلك الأيضي الخاص بتصنيع الكاروتينات

يتكون تصنيع الكاروتينات من عدة جينات Multigenes (Gomez-carcia and Ochoa- 2013) سلك ينظم به تعبير الجينات المشاركة فيه (Gomez-carcia and Ochoa- 2013). يبدأ هذا المسلك بخطوة محددة وهي تصنيع الفايثوين Phytoene (Hirschberg, 2001) Phytoene synthase. تحول الفايثوين إلى بيتاكاروتين -Carotene اللون البرتقالي وهذا بدوره يؤكسد Oxygenated ليشكل الزانثوفيلات Xanthophylls Antheraxanthin Zeaxanthin - cryptoxanthin (Davies et al., 1970 ; Thorup et al., 2000). تنشأ الكاروتينات من مرئب Isopentenyl pyrophosphate (IPP) الكارون واليادى المشترك لكل مرئبات Isoprenoid ن هذا المرئب ومثله الأليلى Dimethyl allyl pyrophosphate (DMAPP) يتكاثان سو- ليعطيا مرئب Geranyl pyrophosphate (GPP) ي ك ي ي ينتج مرئب ذو عشرين ذرة كارون وهو Geranyl geranyl pyrophosphat (GGPP) وهو اليادى المباشر للكاروتينات Immediate precursor of carotenoids وهذا التفاعل يحفزه Geranyl geranyl pyrophosphat synthase(GGPPS) : نزم في البلاستيدات الملونة (Botella-pavia and Rodriguez-concepcion, 2006) يادى المشترك لمختلف المرئبات Chromoplast (Dogbo and Camara, 1987) GGPP يادى المشترك لمختلف المرئبات يزوپيرنويدية Isoprenoids كالجبرلينات Gibberellins Phylloquinones

Naik *et al.*, 2003 ; Botella-pavia and Rodriguez-) Chlorophylls Tocopherols  
(. Concepcion, 2006

Stroma (Dogbo *et al.*, 1987) ن الفايثويين يوجد في سدى

لعدد من النباتات منها الفلفل والذرة والحنطة والشعير. الفايثويين يدخل

Phytofluene Zeta carotene Neurosporene Lycopene ( 2-4).

Double Desaturation reactions زالة التشبع هذه

bonds (ك - كارون) التي تشكل حاملات الصيغة لصيغات الكاروتين وتحول الفايثويين عديم اللون

لى اللايكويين (Naik *et al.*, 2003 ; Botella-Pavia and Rodriguez-  
.Concepcion, 2006)

يتحول اللايكويين الخطي Linear lycopene حلقي لينتج كاروتين الفا وبيتا.

كاروتين : يشفر عنه الجين *Lcy-B* الذي يربط حلقة بيتا ك ليتحول إلى

بيتا كاروتين، كاروتين فينتج : Lycopene E-cyclase الذي يشفر عنه الجين *Lcy-E*

كاروتين ثم يعمل : يشفر عنه الجين *Lcy-B* برط حلقة بيتا ك

كاروتين لكاروتين (Britton *et al.*, 1998 ; Botella-Pavia and Rodriguez-

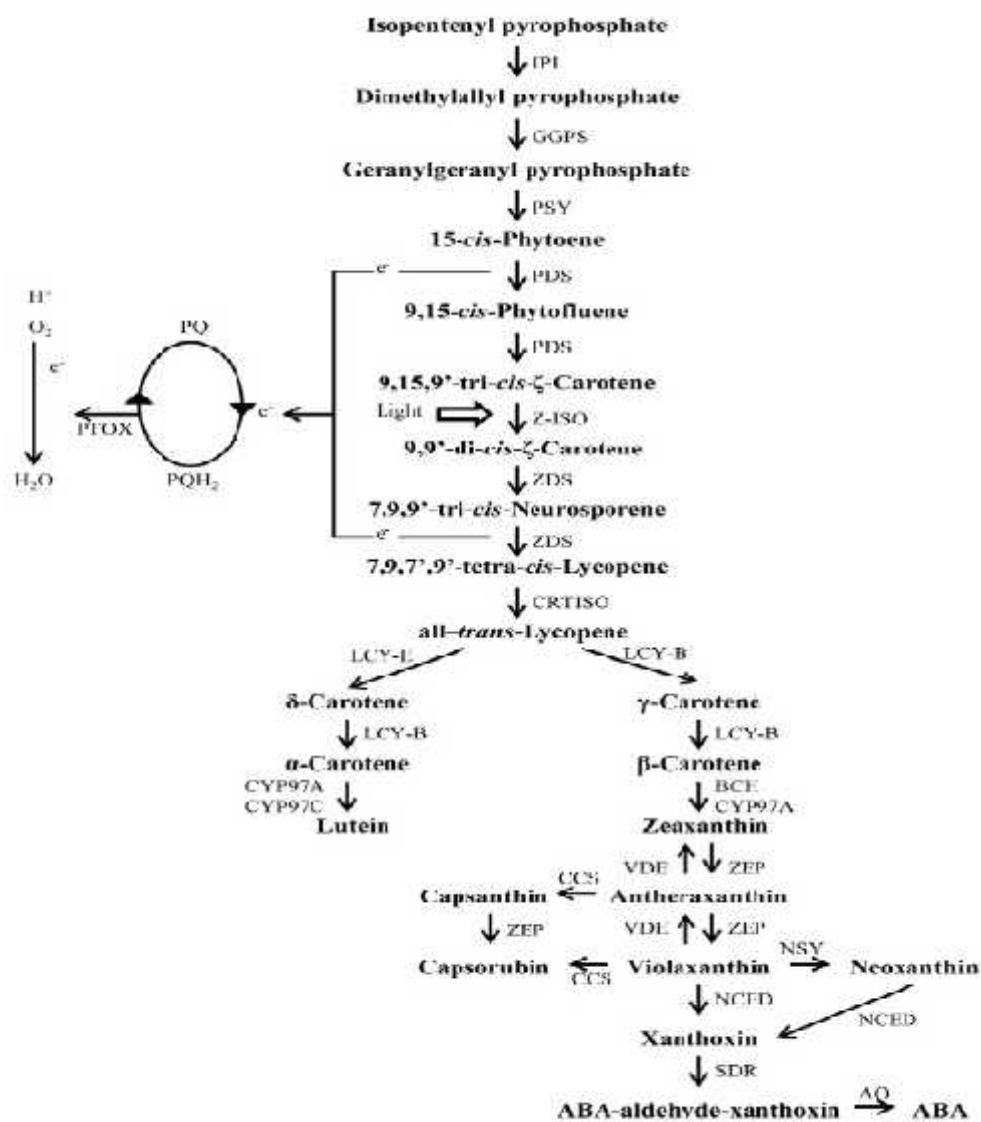
.Concepcion, 2006) لفا كاروتين هو البادئ الوسيطى للـ Lutein الذي يعد الصيغة الكاروتينية

غشية التصنيع الضوئي للنباتات الخضراء (Naik *et al.*, 2003). (Guzman *et*

*al.*, 2010) المسار الأيضي لبناء البيتا-ك وتين -carotene والزرانثين Zeaxanthin

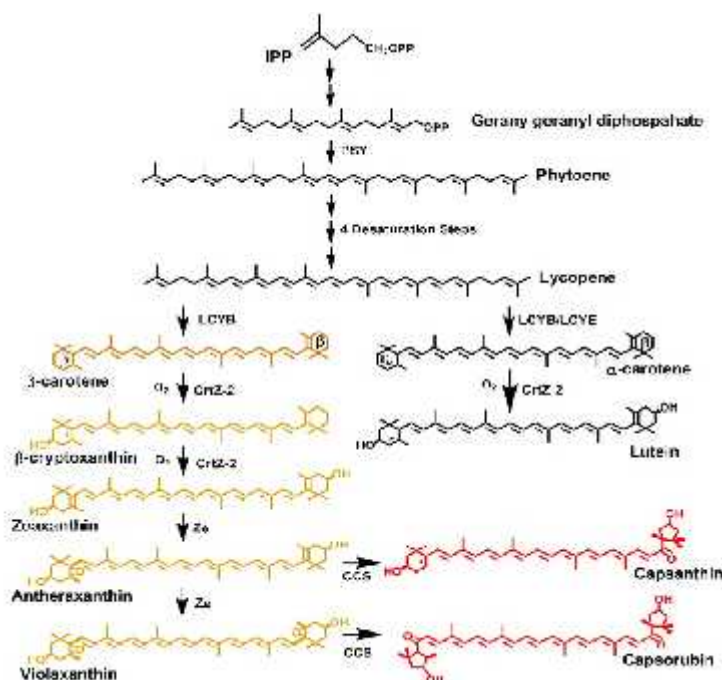
الذي لا يختلف كثيراً عن المسار السابق ولكن وضع فيه دور جين *CrtZ-2* في تحويل البيتا-

كاروتين *carotene* -cryptoxanthin لي الزانثين Zeaxanthin ك (2-5).



ك (2-4): المسلك الأيضي لبناء الكاروتينات

(Gomez-Garcia and Ochoa-Alejo, 2013)



ك (2-5): المسلك الأيضي لبناء الكاروتينات في الفلفل البرتقالي بحسب Guzman *et al.*,

2010

### 2-4-3: الأنزيمات التي تدخل في تصنيع الكاروتينات

1. Isopentenyl pyrophosphate isomerase :  $IPP \rightleftharpoons DMAPP$  ك

ك Reversible isomeration reaction : نزم تصنيع الكاروتينات,

ين فعالية نتاج الكاروتينات في كتيروبا *Escherichia coli*

(Naik *et al.*, 2003).



2. **Geranyl geranyl pyrophosphate synthase**: نزم متعدد الوظائف يحفز نشوء

GGPP : DMAPP IPP

(kuntz et al., 1992).

3. **Phytoene synthase (Psy)**: نزم يحول جزئيتان من GGPP Phytoene

نزم مكرس للتصنيع الحيوي للكاروتين في مسلك التصنيع وقد

الأرابيدوسيس Arabidopsis.

4. **Phytoene desaturase(PDS)**: : Phytoene بخطوتين

Phytofluene z-carotene : من البلاستيديات الملونة

*Capsicum annuum* له تعبير منخفض في الثمار الخضراء ثم يبدأ تعبيره

ثناء النضج تبقى مستوياته ثابتة (Hugueney et al., 1992).

5. **Zeta carotene desaturase(ZDS)**: : Zetacarotene

Lycopene Neurosporene Zetacarotene : بط

يغشاء البلاستيديات الملونة وتمت تثقيته من الفلفل ; (Albrecht et al., 1995

.Breitenbach et al., 1999). ن يخلقان Additional

double bonds لهيكل الفايثوين ذ رعين وبذلك يتحول الكاروتين عديم اللون

(Naik et al., 2003) Lycopene

6. **Lycopene β-cyclase**: نزم يحفز نشوء البيتاكاروتين ثنائي الحلقة من اللايكوين في النباتات

والكثيرا الزرقاء ذ يعمل على ربط حلقتين بيتا في نهاية جزئية اللايكوين الخطية. cDNA

من الفلفل ولوحظ أن التعبير جين هذا الأنزيم يتم خلال تطور الثمرة ويرمز له  
: (Hirschberg *et al.*, 1997 ; Naik *et al.*, 2003) *crtl*

Zeaxanthin : : : **Zeaxanthin hydroxylase (ZEP)** .7

-cryptoxanthin : : : Violaxanthin Antheraxanthin

(Bouvier *et al.*, : : : جين هذا الأ -cryptoxanthin epoxide

.1996 ; Botella-Pavia and Rodriguez-Concepcion, 2006)

Phytoene : : : النيكوتيدية لجينات ك تحليل

Lycopencyclase Phytoene desaturase synthase درجة تشابه عالية بين جينات

هذه الأنزيمات في النباتات : : : تشابه لهذه الأنزيمات بين الك :

(Hirschberg *et al.*, 1997 ; Naik : : : بين النباتات والبكتريا ك :

-cyclase : : : جين *CRTL-b* .et al., 2003)

.(Cunningham *et al.*, 1993 ; Cunningham *et al.*, 1994) *Synechococcus* sp.

(Huguency (Pecker *et al.*, 1996) : : : هذا الجين ك cDNA

.et al., 1995) اما جين *CRTL-e* الذي ينتج : : : E-cyclase ك الأرابيدوسيس

Lycopene - : : : (Cunningham *et al.*, 1996) *Arabidopsis*

: : : Capsanthin-capsorubin synthase (Ccs) : : : .cyclase

: : : *Lcy-b* وذلك بتحفيظه -carotene Lycopene جين *Ccs* ك :

.(Huguency *et al.*, 1995) *E. coli*

## 2-5: التسلسل التتابعي لدنا الجينات المسؤولة عن تصنيع الكاروتينات

دراسة الجينات المسؤولة عن انتاج الكاروتينات كثيراً في دراس

الفلل وأن معرفة التسلسلات النيكلوتيدية لتلك الجينات قد ساهم في معرفة اصول ودرجة القراية لكثير من

Plastid : *Ptox* جين (Carol and Kuntz, 2001) ي

terminal oxidase ودراسة تسلسلات هذا الجين وجد يانه يتألف من تسعة اكسونات وثمانية انترونات.

ن وجود طفرة في هذا الجين في النباتات تؤدي الى التأثير انتاج الكاروتينات وتراكم مادة الفايتون

Phytoene (Carol et al., 1999). cDNA لهذا الجين وجد يانه بطول 1387 ي

Chili تعبيره كان مرتبطاً مع تعبير جيني *Pds ZDS* (Josse

et al., 2000). هذا الجين في البلاستيدات وله دور (Rumeau et

al., 2007)

Z-carotene : Zeta carotene desaturase : جين *ZDS* ي

يكوين Lycopene والنيوروسبورين Neurosporene النيكلوتيدي cDNA

لهذا الجين يشفر انزيم يقدر بحوالي 59 كيلودالتون (Albrecht et al., 1995) وعند تحليل تسلسل

حمض النووية لهذا الجين في المشمش وجدت نسبة تشابه تقدر بـ 82% الجين

مينية بينهما بنسبة 96% (Marty et al., 2005).

*Lycium chinense* ي ينتمي الى العائلة الباذنجانية ايضاً ويستعمل في الطب التقليدي

سيون فقد وجدت نسبة تشابه تقدر بـ 95% سلسلات هذا الجين مع تسلسلات لجين

(Zhao et al., 2014).

جين *PDS* من البلاستيديات الملونة للفلل و cDNA 2000

لأته لجين *PDS* = *Glycine max* = 81%

: هذا الجين يزداد معنوياً خلال التحول البلاستيديات الخضراء الى البلاستيديات الملونة

(Hugueney et al., 1995). (Marty et al., 2005) جين *PDS*

81% = 87% مينية لجين

96% لتسلسلات هذا الجين مع تسلسلاته في نبات *L. chinense*

(Zhao et al., 2014). راسة تسلسل جين *GGps* 369 Open reading frame

cDNA (Badillo et al., 1995) ن هذا الجين يحفز بقوة اثناء

تحول البلاستيديات الخضراء الى البلاستيديات الـ

جين *Lcyb* من البلاستيديات الملونة للفلل (Camara and Dogbo, 1986) cDNA

الذي يشفر نزم المحفز لعملية Cyclization اللايكويين Lycopene البيتا-

كاروتين-carotene. من ثمار الفلفل وعبر عنه في بكتريا *E. coli* (Hugueney et al., 1995)

91% لتسلسلات هذا الجين في الفلفل مع تسلسلات الجين *L.*

(Zhao et al., 2014) *chinense* جين *Psy*

طفرة في هذا الجين يؤدي الى انتاج ثمار فلفل ذات لون برتقالي (Huh et al., 2001)

(Lang et al., 2004) فأن هذه الطفرة تؤدي الى اختزال شديد في الكابساثين Capsanthin

حماض النووية لهذا الجين في المشمش وجد بان نسبة تشايه تصل الى  
 .  
 80% مع الجين ي الفلفل كذلك تشايه في تسلسل الأ مينية بنسبة 87% (Marty et al.,  
 2005) فیر Coding region لهذا الجين في سيع  
 برتقالية اللون مع التسلسلات المحفوظة في بنك الجينات كذلك وجدت انترونات لم تسجل سابقاً (Cuzman  
 et al., 2010). (Kim et al., 2010) Splicing mutation لهذا الجين سببت  
 Point mutation في *C. chinense*  
 Frame shift في Splice acceptor  
 Premature translational termination  
 هذا الجين ظهرت في خمس اصناف  
 الناضجة وغير الناضجة بينما  
 Oriole هذا الجين ط Dove ط  
 في الثمار غير الناضجة ولم تظهر نسخ هذا الجين في كلا المرحلتين  
 Numex sunset  
 (Rodriguez-Uribe et al., 2012). ان تسلسلات هذا الجين في الفلفل  
 تسلسلات هذا الجين في *L. chinense* (Zhao et al., 2014).  
 %94 في

## ((الفصل الثالث))

## 3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 1-3: الأجهزة و المواد والمحاليل المستعملة Instruments, Materials and Solutions

## 1-1-3 : الأجهزة Instruments

استعملت الأجهزة في انجاز هذا البحث كما موضح في جدول (1-3).

جدول (1-3): الأجهزة العلمية المستعملة في هذه الدراسة

أسم الجهاز	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
Laminar flow	LabTech	Korea
Microcentrifuge	Hettich-R220	Germany
Electronic balance	Kern	Germany
Thermo cycler	Esco	Singapore
Nanodrop	Act Gene	USA
U.V transilluminator	Major Science	Taiwan
Gel documentation system	Biocom	USA
pH meter	Milwaukee	Romania
Dry bath	Elite	Taiwan
Water bath	Julabo	Germany
Autoclave	Jaban	India
Vortex mixer	LabTech	Korea
Hot plate and magnatic stirrer	_	China
Water distillatory	LabTech	Korea
UV-Spectrophotometer	Optima SP-3000	Japan
Power supply	Major Science	Taiwan
HPLC	Shimadzu 2010 LC	Japan
Genetic analyzer 3500	Applied Biosystems	USA

### 2-3: المواد والمحاليل المستعملة Materials and Solutions

#### 1-2-3: عينات ثمار الفلفل الحلو Fruit bell pepper samples

جمعت 22 عينة من ثمار الفلفل الحلو الجرسى Bell pepper المحلية والمستوردة من الاسواق المحلية العراقية في محافظة بغداد وصنفت بالاعتماد على شكل الثمرة لعدم وجود السيقان والأوراق النباتية ولم يتسن لنا معرفة فيما اذا كانت العينات ضروباً مستزرعة او نباتات محورة وراثياً لعدم معرفة المصدر الحقيقي للبلاد المصدر لتلك الثمار (جدول 2-3).

جدول (2-3): العينات المدروسة المحلية والمستوردة والمتحصل عليها من الأسواق العراقية في محافظة بغداد \*

ت	نوع ومصدر إنتاج 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	احمر
22	فلفل ايراني	اخضر

\*العينات المدروسة هي ثمار مستزرعة وليست برية

**2-2-3: الصبغات Dyes****1-2-2-3: صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي****Bromophenol blue loading dye for electrophoresis**

حضرت صبغة التحميل باذابة 25 مليغرام من صبغة البروموفينول الأزرق Bromophenol blue في 6.7 مليلتر من الماء المقطر. اضيف 25 مليغرام من صبغة Xylene cyanol FF و 3.3 مليلتر من الكليسرول Glycerol ليصبح الحجم النهائي 10 مليلتر. حفظت الصبغة تحت درجة -20 م° لغرض الاستعمال الطويل الأمد.

**2-2-2-3: صبغة الأيثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr)**

حضرت صبغة الأيثيديوم برومايد Ethidium bromide من المحلول الخزين للصبغة الذي يكون بتركيز 10 مليغرام/مليلتر (صبغة الأيثيديوم برومايد مادة مسرطنة ويجب ارتداء الكفوف المختبرية عند التعامل معها). وضع هلام الآكاروز Agarose gel في حوض منفصل لغرض تصبيغه بمادة الأيثيديوم برومايد التي حضرت باذابتها في الماء المقطر للحصول على تركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر.

**3-2-3: محلول RNase**

حضر محلول RNase بتركيز 10 مايكروغرام/مليلتر من المحلول الخزين الذي يكون بتركيز 1 مليغرام/مليلتر. اخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين وأكمل الحجم بالماء المقطر المعقم DNase-free RNase water الى 1 مليلتر.



**3-2-4: محلول Sodium dodecyl sulfate (SDS)**

حضر المحلول الخزين من SDS بتركيز 20% بحجم 10 مليلتر، باذابة 2 غرام منه في 10 مليلتر من الماء المقطر المعقم.

**3-2-5: دارئ استخلاص الدنا DNA extraction buffer**

. حضر هذا الدارئ بحسب طريقة (Kang and Yang, 2004) من Tris-HCl (pH7.5) بتركيز 100 ملي مولار و EDTA (pH 7.5) بتركيز 50 ملي مولار و NaCl بتركيز 500 ملي مولار ومن  $\beta$ -mercaptoethanol بتركيز 10 ملي مولار.

**3-2-6: محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)**

حضر 10X من هذا الدارئ لغرض استعماله في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis وذلك باذابة 108 غرام من مادة Tris base و 55 غرام من حامض البوريك Boric acid و 40 مليلتر من مادة Ethelene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 0.5 مولاري. اضيف الماء المقطر المعقم وصولاً الى لتر واحد مع تعديل الأس الهايدروجيني (pH) الى 8، كما استعمل الدارئ نفسه المعد من شركة Promega الامريكية.

**3-2-7: دارئ Tris-EDTA (TE) المستعمل في عزل الدنا الكلي**

تكون هذا الدارئ من 0.1 ملي مولار من مادة EDTA و 10 ملي مولار من مادة Tris-HCl والأس الهايدروجيني لهذا الدارئ 8 pH، وحضر باستعمال الماء الخالي من انزيم النيوكليز المعقم .Nuclease-Free water.

**3-2-8: محلول خلات الصوديوم NaOAc بتركيز 3 مولاري Sodium acetate (3M)**

حضر هذا المحلول وذلك باذابة 24.609 غرام من مادة خلات الصوديوم NaOAc في 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم ومن ثم اكمل الحجم إلى 100 مليلتر باستعمال الماء المقطر المعقم.

**3-2-9: تشبيع الفينول Saturation of phenol**

حضر محلول الفينول المشبع بدارئ Tris-HCl بحسب طريقة (Sambrook *et al.*, 1989). اخذ 70 مليلتر من الفينول السائل وسخن إلى درجة 60-70 °م. اضيف اليه 30 مليلتر من دارئ Tris-HCl (pH 8) وبتركيز 500 ملي مولار ومن ثم خلط جيداً وترك بعد ذلك ليستقر. ازيلت الطبقة العليا وأضيف اليه 30 مليلتر اخرى من دارئ (pH 8) Tris-HCl وبتركيز 500 ملي مولار وخلط جيداً وترك المحلول ليستقر ومن ثم ازيلت الطبقة العليا. اعيدت العملية الى ان يتم التميز بين طبقتي دارئ Tris-HCl والفينول. حفظ بعد ذلك تحت درجة حرارة 4 °م وعند الأستعمال اخذ الفينول من تحت الطبقة العليا التي يعتقد بأنها لبقايا دارئ Tris-HCl.

**3-2-10: خليط الفينول/الكلوروفورم/كحول الأيزوأميل****Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)**

حضر هذا الخليط بحجم 50 مليلتر وذلك بخلط 25 مليلتر من الفينول و 24 مليلتر من الكلوروفورم

و 1 مليلتر من كحول الأيزوأميل.

**3-2-11: محلول الأمونيوم بيرسيلفيت (APS) تركيز 10%**

حضر المحلول اسبوعياً وذلك باذابة 1 غرام من هذه المادة في 10 ميليلتر من الماء المقطر المعقم.

**3-2-12: دارئ التحميل Loading buffer في تجارب AFLP-PCR و SSR-PCR**

يتكون هذا الدارئ من الفورمامايد بتركيز 98% EDTA بتركيز 10 ملي مولار وصبغة

البروموفينول الأزرق Bromophenol blue بتركيز 0.005% وصبغة Xylene blue بتركيز

0.005%. حضر الدارئ في الماء الخالي من انزيم النيوكليز المعقم.

**3-2-13: انزيم Proteinase K**

حضر المحلول الخزين لهذا الأنزيم وذلك باذابة 20 مليغرام من مادة Proteinase K في مليلتر

واحد من الماء الخالي من انزيم النيوكليز المعقم Nuclease-Free water.

**Restrictions enzymes الأنزيمات القاطعة 14-2-3**

استعمل انزيمان قاطعان في دراسة AFLP-PCR وبتركيز 1.25 وحدة/مايكروليتر لكل منهما, هما

*EcoR1* المصنع من قبل شركة Promega الأمريكية و*MesI* المصنع من قبل شركة BioLab

البريطانية.

**15-2-3: دارئ تفاعل التقطيع للأنزيمات القاطعة****Reaction buffer (5X) for restriction enzymes**

حضر هذا الدارئ الذي استعمل في اجراء تفاعلات تقطيع دنا ثمار الفلفل في دراسة AFLP-PCR

بتركيز 5X من Tris-HCl (pH 7.5) بتركيز 50 ملي مولار وخلات المغنيسيوم Mg-acetate بتركيز

50 ملي مولار وخلات البوتاسيوم K-acetate بتركيز 250 ملي مولار.

**16-2-3: انزيم رابط الدنا T4 DNA ligase**

استعمل الأنزيم المصنع من قبل شركة Promega الأمريكية بتركيز 1 وحدة/مايكروليتر والمحضر

في محلول مكون من Tris-HCl (pH 7.5) بتركيز 10 ملي مولار ومادة الدايتايوثريتول Dithiothreitol

(DTT) بتركيز 1 ملي مولار وكلوريد البوتاسيوم KCl بتركيز 50 ملي مولار و EDTA بتركيز 0.1 ملي

مولار والكليسيروول بتركيز 50%.

**3-2-17: محلول تفاعل الوصلة المهيأة/الربط Adapter/ligation solution**

حضر هذا المحلول من بوادئ *EcoR1/MesI* adapter و Adenosine triphosphate و (ATP) بتركيز 0.4 ملي مولار و Tris-HCl (pH 7.5) بتركيز 10 ملي مولار و خلات المغنيسيوم Mg-acetate بتركيز 10 ملي مولار و خلات البوتاسيوم K-acetate بتركيز 50 ملي مولار.

**3-2-18: هلام الآكاروز Agarose gel**

حضر هلام الآكاروز بتركيز 1.5% في تجارب RAPD-PCR، و 2% في تجارب الكشف عن جينات البيتا-كاروتين  $\beta$ -carotene، إذ اذيب 0.6 غرام و 0.8 غرام منه، وعلى التوالي في 40 مليلتر من دارئ (TBE) Tris-borate buffer. سخن الخليط عند درجة حرارة 60 °م باستعمال الصفيحة الساخنة Hot plate وحتى ذوبان الخليط وصب في حوض الترحيل المخصص.

**3-2-19: محلول الأكريلاميد:المثيلينيس أكريلاميد الخزين****Acrylamide:Methylenbisacrylamid (19:1)**

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

**3-2-20: هلام البولي أكريلاميد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation**

حضر هذا الهلام باذابة 45 غرام من اليوريا Urea (7.5 مولار) في 10 مليلتر من دارئ TBE بتركيز 10X و 15 مليلتر من المحلول الخزين (19:1) Acrylamide:Methylenbisacrylamid الذي تركيزه 40% في حالة تحضير هلام بتركيز 6% وأكمل الحجم الى 100 مليلتر بالماء المقطر. اضيف لكل 10 مليلتر من هذا الهلام 50 مايكروليتر من المحلول الخزين (APS) Ammonium persulphate بتركيز 10% و 30 مايكروليتر من مادة (TEMED) Tetramethylethylene diamine.

**3-2-21: خليط تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR master mix**

استعمل الخليط Go Taq® Green Master Mix (2X) في تجارب AFLP-PCR، SSR-PCR، RAPD-PCR وتضخيم جينات *Lycb*، *Crtz* و *Ccs*، وبحسب تعليمات النشرة المرفقة من قبل شركة Promega الأمريكية.

**3-2-22: البودئ Primers**

صنعت البودئ في شركة Alpha DNA الكندية وبحسب الطلب.

## 3-2-2-1: البودئ المستعملة في تجارب AFLP-PCR

استعملت تسعة من البودئ الخاصة بدراسة AFLP-PCR وبحسب المصدرين (Vos *et al.*,

2009; Sensoy *et al.*, 1995) والخاصة بدراسات التنوع الوراثي في الفلفل، كما في أدناه:

التسلسل النيوكليوتيدي البادئ (5' → 3')	أسم البادئ	ت
5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	<i>EcoR1</i> adaptors	1
5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	<i>MseI</i> adaptors	2
5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3'	<i>EcoR1</i> primer+A (E <sub>A</sub> )	3
5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C-3'	<i>MseI</i> primer+C (M <sub>C</sub> )	4
5'- GACTGCGTACCAATTC +ACG-3'	E <sub>ACG</sub>	5
5'- GACTGCGTACCAATTC +AAG-3'	E <sub>AAG</sub>	6
5'- GACTGCGTACCAATTC +ACA-3'	E <sub>ACA</sub>	7
5'-GATGAGTCCTGAGTAA+AGG-3'	M <sub>AGG</sub>	8
5'-GATGAGTCCTGAGTAA+AGT-3'	M <sub>AGT</sub>	9
5'-GATGAGTCCTGAGTAA+AAT-3'	M <sub>AAT</sub>	10
5'-GATGAGTCCTGAGTAA+CTG-3'	M <sub>CTG</sub>	11

## 3-2-2-2: البوادئ المستعملة في تجارب Microsatellites-PCR

استعملت ستة بوادئ خاصة بدراسة SSR-PCR وبحسب المصدر (Nagy *et al.*, 2007)

والخاصة بدراسة التنوع الوراثي في الفلفل، كما في ادناه:

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئ (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'-CCTGTGTGAACAAGTTTTTCAGG- 3'

## 3-2-2-3: البوادئ المستعملة في تجارب RAPD-PCR

استعملت خمسة من البوادئ الخاصة بدراسات RAPD-PCR وبحسب المصدر (Bahurupe *et al.*)

(*al.*, 2013) للبوادئ OPB-01، OPB-12 و OPB-15 والمصدر (Sitthiwong *et al.*, 2005)

للبوادئ C43 و C52 والمختصة بدراسة التنوع الوراثي في الفلفل، كما في ادناه:



التسلسل النيوكلوتيدي للبادئ (5' → 3')	اسم البادئ	ت
5'-GGCGGCACAGGA-3'	OPB-01	1
5'-GTCGACGGACGT-3'	OPB-12	2
5'-GTTTCGCTCC-3'	OPB-15	3
5'-CCTTGACGCA-3'	C43	4
5'-GGAGGGTGTT-3'	C52	5

### 3-2-2-4: البوادي المستعملة في تجارب تضخيم جينات *Lcyb*، *Crtz* و *Ccs*

استعمل اثنا عشر بادئاً خاصاً بدراسة بعض الجينات التي لها علاقة بالمسار الأيضي في تكوين β-

Carotene وبحسب المصدر (Guzman *et al.*, 2010). استعملت البوادي الخارجية External primers

(Ext) في تضخيم الجين كاملاً، بينما استعملت البوادي الداخلية Internal primers (Int) في تضخيم

جزء من الجين، الذي استعمل فيما بعد في اجراء تقانة التسلسل التتابعي للDNA Sequencing، كما في

ادناه:

التسلسل النيوكلوتيدي للبادئ (5' → 3')	اسم الجين	ت
<b>Ext: F: 5'- GCACCTTGTTGGGAAAATATGGATACGC- 3'</b> <b>R: 5'- GATCCCAGATAAGTCGAATTCATTC- 3'</b> <b>Int: F: 5'- GCAATGATGGTATTACTATTCAGGCG- 3'</b> <b>R: 5'- CCCAAGTGACTTAAACGAGCCACCATTCGTTC- 3'</b>	<i>Lcyb</i>	1
<b>Ext: F: 5'- CCTTCACCGTACCGTACATGGC- 3'</b> <b>R: 5'- GCGAAGCTTGTTGTATTATATACTTATATA- 3'</b> <b>Int: F: 5'- GTACATTCGCTCTCG- 3'</b> <b>R: 5'- CCTGATGTGCTGCAGCTACTCTC- 3'</b>	<i>Crtz</i>	2
<b>Ext: F: 5'- CCTTTCCATCTCCTTTACTTTCCATT- 3'</b> <b>R: 5'- AAGGCTCTCTATTGCTAGATTGCCAG- 3'</b> <b>Int: F: 5'- GCCAAGGTTTTGAAAGTGC- 3'</b> <b>R: 5'- CGGAAGTGGTCCTCCC- 3'</b>	<i>Ccs</i>	3

اذيبت جميع البودئ اعلاه باستعمال الماء الخالي من انزيم النيوكليز Nuclease-Free water وبحسب تعليمات النشرة المرفقة من قبل الشركة المصنعة.

### 3-2-23: معلمات الدليل الحجمي للدنا DNA molecular weight markers

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 للفلل وباستعمال الواصمات الجزيئية اعلاه وذلك لصغر قطع الدنا المتحصل عليها.

### 3-2-24: عدة تنقية الدنا الناتج من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

استعملت العدة AccuPrep®PCR Purification kit الخاصة بتقنية نواتج تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والمصنعة من قبل شركة BiONEER Corp الكورية وبحسب تعليمات النشرة المرفقة من قبل الشركة.

### 3-2-25: مادة BigDye terminator V3.1

استعملت مادة BigDye terminator V3.1 المصنعة من قبل شركة Applied Biosystems الأمريكية. استعمل 0.5X من هذه المادة بعد تخفيفها بدارئ التسلسل التتابعي 5X Sequencing buffer والمصنع من الشركة نفسها اعلاه، وبحسب تعليمات النشرة المرفقة من قبل الشركة.

**3-2-26: عدة تنقية BigDye XTerminator Purification Kit**

استعملت عدة التنقية BigDye XTerminator Purification kit المصنعة من قبل شركة Applied Biosystems الأمريكية لغرض تنقية ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل وبوجود مادة BigDye terminator V3.1 في التفاعل، وبحسب تعليمات النشرة المرفقة من قبل الشركة.

**3-3: طرائق العمل Methods****3-3-1: استخلاص الدنا الكلي من ثمار الفلفل الحلو Bell pepper**

استخلص الدنا الكلي من ثمار الفلفل الحلو حسب طريقة (Kang and Yang, 2004) مع بعض التحويرات. اخذ 1 غم تقريباً من ثمار الفلفل الحلو المجفف باستعمال النتروجين السائل Liquid nitrogen ووضع في انبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مليلتر. سحقنا انسجة ثمار الفلفل الحلو في 100 مايكروليتر من دارئ استخلاص الدنا DNA extraction buffer باستعمال قضيب بلاستيكي لمدة من 15-20 ثانية. اضيف 300 مايكروليتر اضافي من دارئ استخلاص الدنا وسحقنا ايضاً انسجة ثمار الفلفل لمدة من 15-20 ثانية كما في اعلاه. اضيف 40 مايكروليتر 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 مايكروليتر انزيم من DNase-free RNase A من المحلول الخزين 10 مليغرام/مليلتر (فقرة 3-2-3) وحضنت تحت حرارة 37 °م لمدة 60 دقيقة. اضيف 200 مايكروغرام من انزيم Proteinase K او 10 مايكروليتر من المحلول الخزين 20 مليغرام/مليلتر (فقرة 3-2-13) وحضنت تحت حرارة 50 °م لمدة 60

دقيقة. اضيف حجم متساو الى العينة من خليط Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) (فقرة 3-2-10) 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 Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) ومن ثم نبذت مركزياً عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت حرارة 4 °م ونقل الجزء الطافي الى انبوبة جديدة. اضيف 500 مايكروليتر 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 وأضيف 1/10 من حجم العينة مادة من مادة خلات الصوديوم NaOAc بتركيز 3 مولاري وأضيف حجمان 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. تم التخلص 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 °م وتم التخلص من الجزء الطافي ومن ثم جففت العينة بتركها لمدة 10 دقائق في المختبر لغرض التخلص من الأيثانول المتبقي وعلقت مرة أخرى في 100 مايكروليتر من TE buffer. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال Nanodrop باستخراج نسبة  $A_{260}/A_{280}$  وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الامتصاص له هي  $1.8 \pm 0.1$  (Clarck, 1997), وحفظت العينة بعد ذلك تحت حرارة -20 °م.

## 3-3-2: التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة AFLP-PCR

درس التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة AFLP-PCR بحسب المصدر (Vos et al., 1995)، مع بعض التحويلات.

## 1. تقطيع دنا ثمار الفلفل باستعمال الأنزيمات القاطعة

**Restriction digestion of pepper Fruit DNA**

وضع 250 نانوغرام (تقريباً 18 مايكروليتر) من كل عينة من دنا ثمار الفلفل في 5 مايكروليتر من دارئ تفاعل التقطيع للأنزيمات القاطعة بتركيز 5X وبوجود 2 مايكروليتر من الأنزيمين القاطعين *EcoR1(E)/MesI (M)* بتركيز نهائي 1.25 وحدة/مايكروليتر لكل منهما في انبوبة Eppendorf حجم 1.5 مليلتر. اكمل الحجم إلى 25 مايكروليتر بالماء الخالي من انزيم النيوكليز المعقم. خلطت المواد بلطف ونبذت مركزياً لمدة قصيرة. حضن خليط التفاعل لمدة ساعتين تحت درجة حرارة 37 °م، وبعد ذلك حضن خليط التفاعل لمدة اضافية 15 دقيقة تحت درجة 70 °م لغرض تثبيط الأنزيمين القاطعين. وضعت انبوبة Eppendorf الحاوية على خليط التفاعل على الثلج وجمع التفاعل بنبذها مركزياً لمدة قصيرة.

2. ربط الوصلة المهيأة **Ligation of adapters**

اجري هذا التفاعل لكل عينة باضافة 24 مايكروليتر من محلول تفاعل الوصلة المهيأة/الربط Adapter/ligation solution و 1 مايكروليتر من انزيم رابط الدنا T4 DNA ligase T4 الى ناتج التفاعل في الخطوة الأولى اعلاه. خلط الخليط جيداً تحت درجة حرارة الغرفة ونبذت مركزياً وحضنت تحت حرارة 20 °م لمدة ساعتين. اخذ 10 مايكروليتر من الناتج وأضيف اليه 90 مايكروليتر من دارئ TE

buffer وخلطت جيداً لتصبح قيمة التخفيف عشر مرات. الجزء المتبقي من التفاعل حفظ تحت حرارة -20 °م.

### 3. تفاعل قبل التضاعف Preamplification

اجري هذا التفاعل لغرض ربط البودئ  $EcoR1+A (E_A)$  و  $MesI+C (M_C)$  بقطع الدنا التي تم ربط الوصلة المهيأة لها في الخطوة السابقة، كما في أدناه:

المركب Component	الحجم (مايكروليتر)
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5
البادئ $EcoR1+A (E_A)$	20
البادئ $MesI+C (M_C)$	20
قالب الدنا DNA template من الخطوة السابقة	5
ماء خال من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية 60

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج

الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

الخطوات	درجة الحرارة (°م) والدورات	الوقت (ثانية)
مسح القالب Denature template	94	30
الالتحام Annealing	56	60
الاستطالة Extension	72	60

نتاج التفاعل قد خفف اربع مرات وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من الناتج وأضيف له 30 مايكروليتر

من دارئ TE وحفظ تحت حرارة -20 °م.

4. تفاعل تضاعف AFLP

خفف ناتج الدنا المضخم في الخطوة السابقة الى اربع مرات وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من ناتج

الدنا وأضيف له 30 مايكروليتر من دارئ TE. اجري التفاعل لحجم كلي 60 مايكروليتر كما في أدناه:

الحجم (مايكروليتر)	المركب Component
12.5	Go Taq® Green Master Mix (2X)
20	البادئ * E <sub>ACG</sub>
20	البادئ * M <sub>AGG</sub>
5	قالب الدنا DNA template من الخطوة السابقة
2.5	ماء خال من النيوكليز Nuclease-Free water

\* = تم استعمال التوافقان التاليان، فضلاً عن التوافق الأول اعلاه وهما: التوافق الثاني E<sub>AAG</sub>/M<sub>AAT</sub> والتوافق الثالث E<sub>ACA</sub>/M<sub>CTG</sub>.

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج

الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

الخطوات	درجة الحرارة (م°)	عدد الدورات	الوقت (ثانية)
مسح القالب Denature template	94	1	30
الالتحام Annealing	65	1	30
الاستطالة Extension	72	1	60
مسح القالب Denature template	94	12 دورة وتخفيض	30
الالتحام Annealing	64.3	درجة الحرارة بمقدار	30
الاستطالة Extension	72	0.7 م° لكل دورة	60
مسح القالب Denature template	94	35 دورة	30
الالتحام Annealing	55.9		30
الاستطالة Extension	72		60
الاستطالة النهائية Final Extension	72	1	10 دقائق
المرحلة النهائية للحضن		4	حسب الرغبة

حمل 10 مايكروليتر من نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البودئ اعلاه لعينات الفلفل الحلو وأضيف لها 10 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer (فورمومايد بتركيز 98%، EDTA (pH 8) بتركيز 10 ملي مولار، بروموفينول الأزرق بتركيز 0.005% وصبغة Xylene cyanol بتركيز 0.005%). مسخ Denatured ناتج التفاعل تحت حرارة 95 °م ولمدة 5 دقائق ومن ثم وضع مباشرة على الثلج. اخذ 5 مايكروليتر من هذا الناتج لكل عينة وحملت العينات في المكان المخصص لها على هلام البولي اكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation بتركيز 6%، كما حمل الواصلم 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 ساعتين او الى ان تصل صبغة التحميل على بعد 2-3 سنتيمتر من اسفل الهلام. صبغ هلام البولي اكريلمايد بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

### 3-3-3: التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة SSR-PCR

درس التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة تكرار التسلسل البسيط SSR-PCR. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبودئ المستعملة وبحسب المصدر (Nagy *et al.*, 2007) مع بعض التحوير، كما في ادناه:



التركيز	الحجم (مايكروليتر)	المركب Component
1X	12.5	Go Taq® Green Master Mix (2X)
1.0 مايكرومولار	2	البادئ Primer
100 نانوغرام	2	قالب الدنا DNA template
-	لغاية حجم 25	Nuclease-Free water من النيوكليز

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج

الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

الوقت (دقيقة)	درجة الحرارة (م°) والدورات	الخطوات
3	94	مسح القالب Denature template
1	35 دورة	المسح الأولي Initial denaturation
1		الالتحام Annealing
1		الاستطالة Extension
7	72	الاستطالة النهائية Final Extension
حسب الرغبة	4	المرحلة النهائية للحضن

حمل 10 مايكروليتر من نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البودئ اعلاه لعينات الفلفل الحلو

وأضيف لها 10 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer (فورمومايد بتركيز 98%، EDTA

(pH 8) 10 ملي مولار، بروموفينول الأزرق بتركيز 0.005% وصبغة Xylene cyanol بتركيز

0.005%). مسخ Denatured ناتج التفاعل تحت حرارة 95 م° ولمدة 5 دقائق ومن ثم وضع مباشرة على

الثلج. اخذ 5 مايكروليتر من هذا الناتج لكل عينة وحملت العينات في المكان المخصص لها على هلام

البولي اكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation بتركيز 6%، كما حمل المعلم

الجزئي الوراثي بحسب تعليمات النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. ورحلت العينات

كهربيائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربيائي 75 فولت ولمدة

ساعتين او الى ان تصل صبغة التحميل على بعد 2-3 سنتيمتر من اسفل الهلام. صبغ هلام البولي اكريلمايد بصبغة الأثيديوم برومايد (EtBr) Ethidium bromide لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

### 3-3-4: التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة RAPD-PCR

درس التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو باستعمال تقانة الدنا متعدد الأشكال مضخم عشوائياً (RAPD-PCR) Random amplified polymorphic DNA. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبادئ الأول OPB-01 والبادئ الثاني OPB-12 والبادئ الثالث OPB-15 بحسب المصدر (Bahurupe *et al.*, 2013)، وللبادئ الرابع C43 والبادئ الخامس C52 بحسب المصدر (Sitthiwong *et al.*, 2005) تحت ظروف مبردة مع بعض التحويرات، كما في أدناه:

التركيز	الحجم (مايكروليتر)	المركب Component
1X	12.5	Go Taq® Green Master Mix (2X)
1.0 مايكرومولار	2.5	البادئ Primer
100 نانوغرام	2	قالب الدنا DNA template
-	لغاية حجم 25	ماء خال من النيوكليز Nuclease-Free water

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج

الجهاز للحصول على ظروف التفاعل للبادئ OPB-01، OPB-12 و OPB-15، كما في ادناه:

الوقت (دقيقة)	درجة الحرارة (م°) والدورات	الخطوات
5	94	Denature template مسخ القالب
1/2	45 دورة	Initial denaturation مرحلة المسخ الأولي
1		Annealing الالتحام
2		Extension الاستطالة
10	72	Final Extension مرحلة الاستطالة النهائية
حسب الرغبة	4	المرحلة النهائية للحضن

أما ظروف التفاعل للبواي C43 و C52 فكانت كما في ادناه:

الوقت (دقيقة)	درجة الحرارة (م°) والدورات	الخطوات
5	94	Denature template مسخ القالب
1/2	40 دورة	Initial denaturation مرحلة المسخ الأولي
15 ثانية		*Annealing الالتحام
1		Extension الاستطالة
5	72	Final Extension مرحلة الاستطالة النهائية
حسب الرغبة	4	المرحلة النهائية للحضن

\*= درجة التحام البادئ C43 هي 56 م°، بينما درجة التحام البادئ C52 هي 52.58 م°

حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البواي اعلاه لعينات الفلفل الحلو في المكان المخصص لها في هلام الأكاروز بتركيز 1.5%، كما حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي Bromophenol blue في كل عينة بحجم 3 مايكروليتر ورحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين. صبغ هلام الأكاروز

بصبغة الأثيديوم برومايد (EtBr) Ethidium bromide لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بواسطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

### 3-3-5: استخلاص الكاروتينات من ثمار الفلفل

#### Carotenoid extraction from pepper fruits

استخلصت الكاروتينات بحسب طريقة (Howard *et al.*, 2000). طحن 10 غرام من ثمار الفلفل المجمدة بالنيتروجين السائل. اضيف 10 مليلتر من الأسيتون المبرد -20 °م الى ثمار الفلفل المطحونة لغرض استخلاص الكاروتينات. المحلول المتجانس من الفلفل والأسيتون مرر عبر اربع طبقات من القماش الجبني Cheese cloth. اضيفت كميات اضافية من الأسيتون المبرد، وأعيدت العملية ثلاث مرات. نبذ المحلول المتجانس مركزياً عند 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. جمع الجزء الطافي ورشح عبر ورق ترشيح واتمان الخاص باستعمالات HPLC قياس 0.45 ملليمتر. عين تركيز الكاروتينات باستعمال جهاز HPLC بعد ان بخر باستعمال مبخر يعمل بنظام Büchi system, Germany لغرض تجفيف المستخلص الذي اعيد ذوبانه باضافة 1 مليلتر من الطور الحركي Mobile phase للحصول على 1 مليلتر من حجم المستخلص النهائي. خضعت 20 مايكروليتر للتحليل بجهاز HPLC. الطور الحركي يتكون من المذيب A (Solvent A) المتكون من (9:1) Acetonitrile-water وخلات الأثيل Ethyl acetate الذي يمثل المذيب B (Solvent B). كانت ظروف القياس بجهاز HPLC كما يأتي:

Shimadzu 2010 LC, Japan	اسم الجهاز Instrument
Shimadzu SPD-M10 photodiode array	الكاشف Detector
450 نانوميتر	الطول الموجي Wavelength
20 مايكروليتر	حجم العينة المحقونة Injection volume
Spherisorb ODS-2 column, 3 $\mu$ m, particle size (50 x 2 mm I.D)	العمود Column
1 مليلتر/دقيقة	نسبة الجريان Flow rate
A: Acetonitrile: water (9:1 v/v) B: Ethyl acetate	الطور الحركي Mobile phase

نتج عن عملية الفصل رسم منحنى Peak لكل عينة مقروناً بزمن الاحتجاز الخاص بها، وحسب تركيز صبغة البيتا-كاروتين عن طريق مقارنة نتائج التقدير الكمي لصبغة البيتا-كاروتين في نماذج عينات الفلفل الحلو المدروسة لكل من زمن الاحتباس Retention time ومساحة الحزم Bands area المجهولة للنماذج مع زمن الاحتباس ومساحة المنحني لصبغة البيتا-كاروتين القياسية المعروفة. حضرت صبغة البيتا-كاروتين القياسية  $\beta$ -carotene standard بتركيز 25 مايكروغرام/مليلتر وحسب تركيز البيتا-كاروتين وفق المعادلة الآتية:

تركيز المركب في العينة = (مساحة حزمة المركب / مساحة حزمة النموذج القياسي)  $\times$  تركيز النموذج القياسي  $\times$  عدد مرات التخفيف

3-3-6: الكشف عن جينات *Ccs* و *Crtz*، *Lycb*

كشفت عن جينات *Ccs* و *Crtz*، *Lycb* في ثمار الفلفل الحلو والخاصة بالمسار الأيضي لبناء  $\beta$ -

Carotene باستعمال تقانة PCR. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب

المصدر (Guzman *et al.*, 2010) مع بعض التحوير، كما في ادناه:

التركيز	الحجم (مايكروليتر)	المركب Component
1X	12.5	Go Taq® Green Master Mix (2X)
1.0 مايكرومولار	2	البادئ * Primer
100 نانوغرام	2	قالب الدنا DNA template
-	لغاية حجم 25	Nuclease-Free water ماء خال من النيوكليز

\* = استعملت البوادئ الخارجية (Ext) External primers في تضخيم الجين كاملاً، بينما استعملت البوادئ

الداخلية (Int) Internal primers في تضخيم جزء من الجين، الذي استعمل فيما بعد في اجراء تقانة التسلسل المتتابعي للندنا DNA Sequencing

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج

الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في ادناه:

الوقت (دقيقة)	درجة الحرارة (م°) والدورات	الخطوات
5	94	مسح قالب Denature template
1	35 دورة	المسخ الأولي Initial denaturation
1		الالتحام Annealing
2		الاستطالة Extension
5	72	الاستطالة النهائية Final Extension
حسب الرغبة	4	المرحلة النهائية للحضن

حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البودئ اعلاه لعينات الفلفل الحلو في المكان المخصص لها في هلام الآكاروز بتركيز 2%، كما حمل المعلم الجزيئي الوراثي بحسب تعليمات النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي Bromophenol blue في كل عينة بحجم 3 مايكروليتر ورحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين. صبغ هلام الآكاروز بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بواسطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

### 3-3-7: التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing

اجري التسلسل التتابعي للدنا في المختبر الخدمي المركزي/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم. استعملت تقانة التسلسل التتابعي للدنا في دراسة التباين الوراثي على المستوى التيكلوئيدي للجينات *Crtz*، *Ccs* و *Lycb* في بعض عينات الفلفل التي جمعت في هذه الدراسة. نقيت نواتج PCR باستعمال عدة التنقية المصنعة من قبل شركة Bionner الكورية، وبحسب النشرة المرفقة. اجري تفاعل PCR في انبوبة PCR الخاصة حجم 0.2 مليلتر، وبحسب طريقة العمل الموصى بها من قبل شركة Applied Biosystems وبتركيز نهائي 0.5X لمادة BigDye terminator V3.1 كما في ادناه:

التركيز	الحجم (مايكروليتر)	المركب Component
1X	4	BigDye terminator V3.1
5 X	2	5X Sequencing buffer
3.2 بيكومول	1	البادئ* Primer
100 نانوغرام	2	قالب الدنا المنقى DNA template
-	الحجم لغاية 20	Nuclease-Free water ماء خال من النيوكليز

\* = استعملت البودئ كلاً بحسب الجين المدروسة، وتكون اما امامية Forward او راجعة Reverse.

بعد خلط المكونات اعلاه باستعمال جهاز الرجاج Vortex نبذت سريعاً بجاز الطرد المركزي.

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز

للحصول على ظروف التفاعل، كما في ادناه:

الوقت (ثانية)	درجة الحرارة (م°) والدورات	الخطوات
60	96	مسخ القالب Denature template
15	30 دورة	المسخ الأولي Initial denaturation
10		الالتحام Annealing
240		الاستطالة Extension
حسب الرغبة	4	المرحلة النهائية للحضن

نقلت العينات اعلاه على طبق جهاز التحليل الوراثي Genetic analyzer 3500 والحاوي على

96 حفرة ومن ثم نقت نواتج التفاعل اعلاه (20 مايكروليتر لكل عينة) باستعمال عدة التنقية BigDye

XTerminator Purification kit وبحسب النشرة المرفقة، إذ وضع 90 مايكروليتر من محلول SAM

و 20 مايكروليتر من محلول خليط تفاعل التسلسل التتابعي Sequencing reaction في كل حفرة حاوية

على ناتج PCR اعلاه. رج الطبق الحاوي على العينات باستعمال جهاز الرجاج Vortex لمدة 30 دقيقة.

نبذت العينات بطردها مركزياً لمدة دقيقة وحمل الطبق بعد ذلك بجهاز التحليل الوراثي وقُرئت النتائج بعد



استعمال بروتوكول BDxStdSeq50\_POP7\_1BDTv3.1\_PA\_Protocol والمزود مع البرنامج الخاص للجهاز.

### 3-3-8: التحليل الاحصائي

حولت نتائج الحزم المتحصل عليها بتقانة AFLP-PCR، SSR-PCR و RAPD-PCR الى مصفوفة ثنائية البعد Two-dimensional matrix وذلك باعطاء رقم 1 عند وجود الحزمة ورقم 0 لعدم وجودها. حلت النتائج باستعمال برنامج احصائي متخصص (Hammer, Past software ver. 1.92) (Hammer, 2001). درست العلاقة الوراثية بين ضروب الفلفل الحلو المدروسة باستعمال تقنية Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)، إذ درست شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستعمال معامل Jaccard للتشابه الوراثي كما درس البعد الوراثي بالاعتماد 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 البوادي (%) 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. نتائج دراسة التسلسل المتتابعي للدنا قد حلت باستعمال برنامج Chromas Pro المصنع من قبل شركة Technelysium Pty Ltd. (ChromasPro version 1.6, 2012). وبرنامج BioEdit (Hall, 1999) Sequence Alignment Editor.

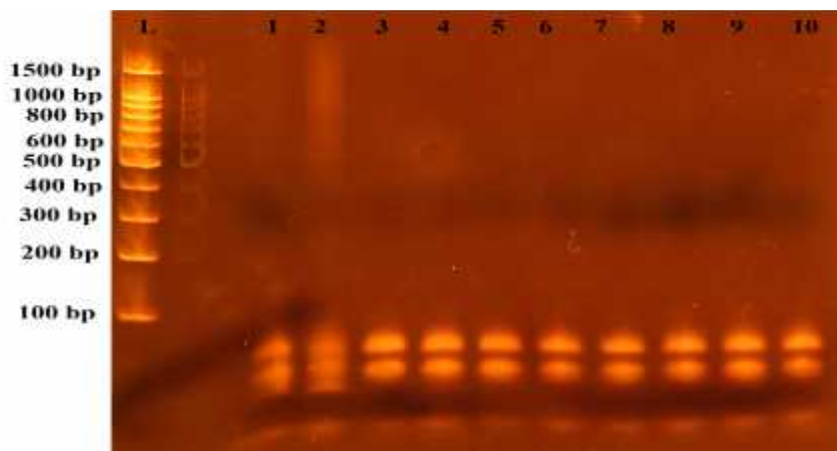
## (الفصل الرابع)

## 4: النتائج والمناقشة Results and Discussion

## 4-1: التضخيم العشوائي للدنا AFLP-PCR

درس التغيرات الوراثية باستخدام تقانة AFLP-PCR ولثلاثة توافقات بين البوادي المستعملة في جميع العينات ما عدا عيني الفلفل الإيطالي الأحمر والأخضر وذلك لنفاذ الدنا المستخلص لهما وعدم تمكننا من جلب كمية اخرى من هذه العينات لنفاذها من الأسواق المحلية. التوافقات المستعملة التي درس من خلالها التغيرات الوراثية في الفلفل هي التوافق الأول  $E_{ACG}/M_{AGG}$ ، التوافق الثاني  $E_{AAG}/M_{AAT}$ ، والتوافق الثالث  $E_{ACA}/M_{CTG}$ . انتجت التوافقات الثلاثة 15 حزمة في جميع العينات ونتاج التوافق الأول منها 4 حزم في عينات الفلفل المدروسة وعدد ثلاثة حزم احادية الشكل Monomorphic bands في كل عينة، ما عدا عيني الفلفل الأردني البرتقالي والأحمر التي انتجت اربع حزم في كل عينة كانت واحدة منها متعددة الأشكال Polymorphic bands و 25% وكان كفاءة التوافق Primer efficiency 21.43%

فعالية تميزة Discriminatory power 100% (ك 1-4). وكان كفاءة التوافق 4 عينة كانت جميعها احادية الشكل ولم تظهر اي كفاءة التوافق 28.57% فعالية تميزة بنسبة 0% (ك 2-4)، بينما انتج التوافق الثالث 7 كفاءة التوافق 50% وكان كفاءة التوافق 50% فعالية تميزة بنسبة 0% عينة كانت جميعها ا كفاءة التوافق 100% (ك 3-4) (ك 1-4)، علماً بأنه كان عدد الحزم الكلية الناتجة في جميع عينات الفلفل 282



$E_{ACG}/M_{AGG}$

٤

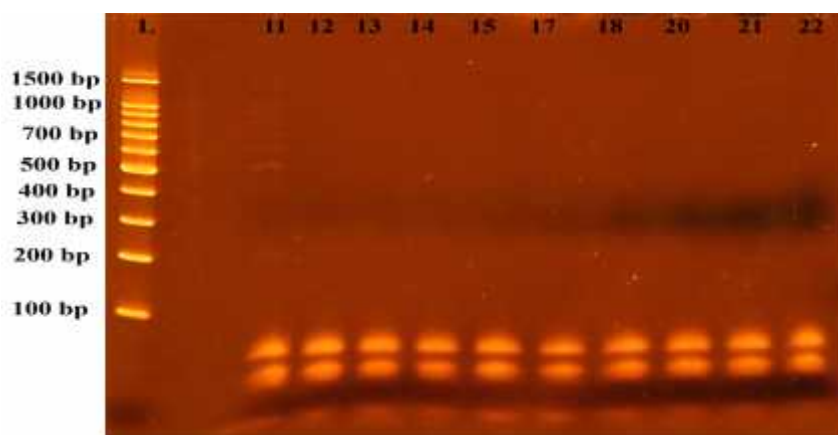
٤

(1-4): الترحيل الكهربائي

AFLP-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :17 :18 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



$E_{ACG}/M_{AGG}$

٤

٤

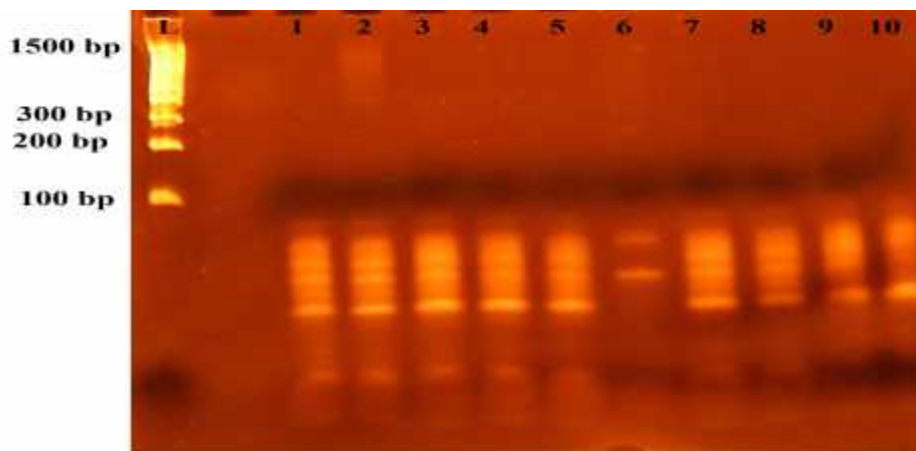
(1-4): الترحيل الكهربائي

AFLP-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :11 :12 :13 :14 :15 :17 :18 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)





$E_{ACA}/M_{CTG}$

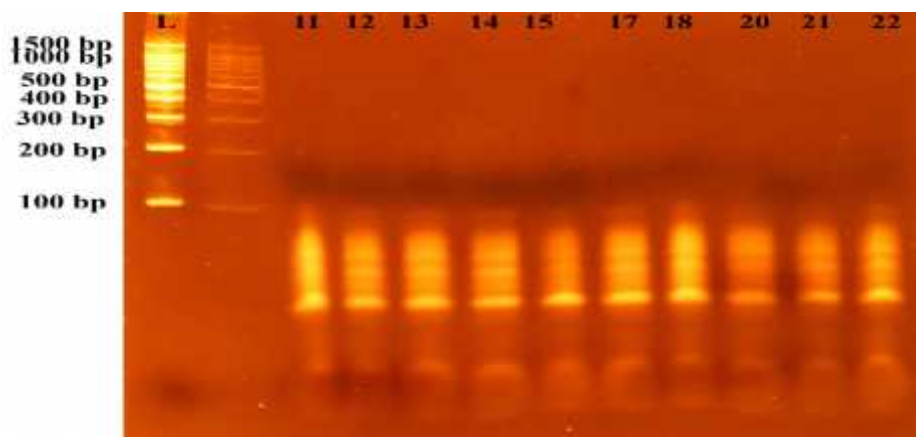


(3-4): الترحيل الكهربائي

AFLP-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4  
 فلفل صيني :5 :6 :7: فلفل عراقي/يوسفية :8  
 فلفل صيني :9 / :10: فلفل صيني

(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



$E_{ACA}/M_{CTG}$



(3-4): الترحيل الكهربائي

AFLP-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :11 ( :12: فلفل صيني برتقالي :13  
 يراني :14 يراني برتقالي، :15 يراني :17 :18  
 :20 :21 :22: يراني

(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

AFLP-PCR باستخدام ثلاث توافقات بين البوادي المستعملة : (1-4)

التمييزية (%)	بين البوادي (%)	التمييزية (%)	ك	ك	ت
100	21.43	25	1	3	E <sub>ACG</sub> /M <sub>AGG</sub>
0	28.57	0	0	4	E <sub>AAG</sub> /M <sub>AAT</sub>
0	50	0	0	7	E <sub>ACA</sub> /M <sub>CTG</sub>
100	100	-	1	14	

ان نقص او انعدام التغيرات الوراثي = = ساس الجيني الضيق لهذا النبات،  
 نواع النباتية ذات التلقيح الذاتي كالمطاطا *Lycopersicon* (العائدة للعائلة الباذنجانية) *esculentum* شكلياً في مجيها (Hiroaki *et al.*,  
 (Kochieva and .2000 ; Young *et al.*, 2004 ; Garcia-Martinez *et al.*, 2006) Ryzhova, 2003) بينا  
 شكلي كانت قيمته 16.5% AFLP. هذا التغيرات المنخفض (Lanteri *et al.*, 2003) عند اختيار عينات من الفلفل الايطالي وكذلك الحال بالنسبة للفلفل  
 التغيرات = تقارب كبير = ي Accession جيني (Toquica *et al.*, 2003) Limited genepool  
 (Portis *et al.*, 2004) انخفاض التغيرات الوراثي للفلفل الاي نواع معينة حسب المعايير التي يحددها المرعي.

لغة ربما تسهم في وجود تباين وراثي بين أنماط الفلفل حصل عليها (Geleta *et al.*, 2005) AFLP بينما

كانت نسبة التباين اقل بين أنماط الفلفل الأثيوبي الحار ذي AFLP لها العديد من النيكلوتيدية اقل من 90% (Vuylsteke *et al.*, 2007) (Aktas *et al.*, 2009) كانت نسبة التعدد الشكلي

AFLP في بعض القطع نظراً لوجود تباين كبير في التسلسلات النيكلوتيدية في العينات 60 %26  $E_{ACG} \setminus M_{AGT}$

29  $E_{AAG} \setminus M_{AAT}$  وهذا العدد من الحزم مغاير لنتائج الدراسة الحالية عند استعمال المذكورة اعلاه وهذا يرجع ف عينات الفلفل في كلا الدراستين من حيث انماطها وقد يعود السبب ايضاً PCR (Aktas *et al.*, 2009) صيغة الاثيديوم برومايد والتي تكون دقتها اقل من صيغة نترات الفضة والتعليم الوراثة لعينات

فضة للتباين الوراثي ناتجة عن الـ AFLP Artificial selection

Alata . ان معظم اصناف الفلفل النامية في ترميا ذات تلقيح مفتوح Open Local landraces لا تزال تزرع في مزارع صغيرة متعددة وفقا pollinated

لذلك نرى ان العديد من المربين تحولوا من زراعة اصناف التقليدية (Bozokalfa *et al.*, 2009).

Limited gene pool الجيني

ي الثمار الكبيرة كذلك يعكس الطبيعة المحافظة لمجين الفلفل المدجن بسبب التلقيح الذاتي (Snigir *et al.*, 2013). ان التغيرات الوراثي للفلفل الهندي والتايواني كان متقارباً

*C. annuum* AFLP

ط *C. baccatum*. ان هذه 414 389

*C. baccatum*

(Krishnamurthy *et al.*, 2015) هذه النتيجة ثير

ط Founder effect

(Baral and Bosland , 2002 ; Thul *et al.*, 2009).

#### 4-1-1: مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة)

#### AFLP-PCR

عينات ثمار الفلفل

Jaccard للتشابه الوراثي. يتضح من الشكل (4-4) بأن العينات قد

توزعت ضمن التحليل العنقودي في مجاميع رئيسة. المجم

الأحمر والبرتقالي، بينما المجموعة الثانية ضمت الفلفل /

عينات



وضح هذا المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو الأردني

عينات الفلفل الا / 0.94 ، بينما ❖

❖ مع عينة الفلفل / 0.68. العينات الأخرى تشابهاً عالياً وقيمة

❖ 1. تعد هذه الدراسة من التباير ❖

❖ AFLP-PCR نظر لعدم وجود مصادر رسمية تؤكد صل ومنشأ عينات

❖ الحلو المستوردة كان من الصعوبة

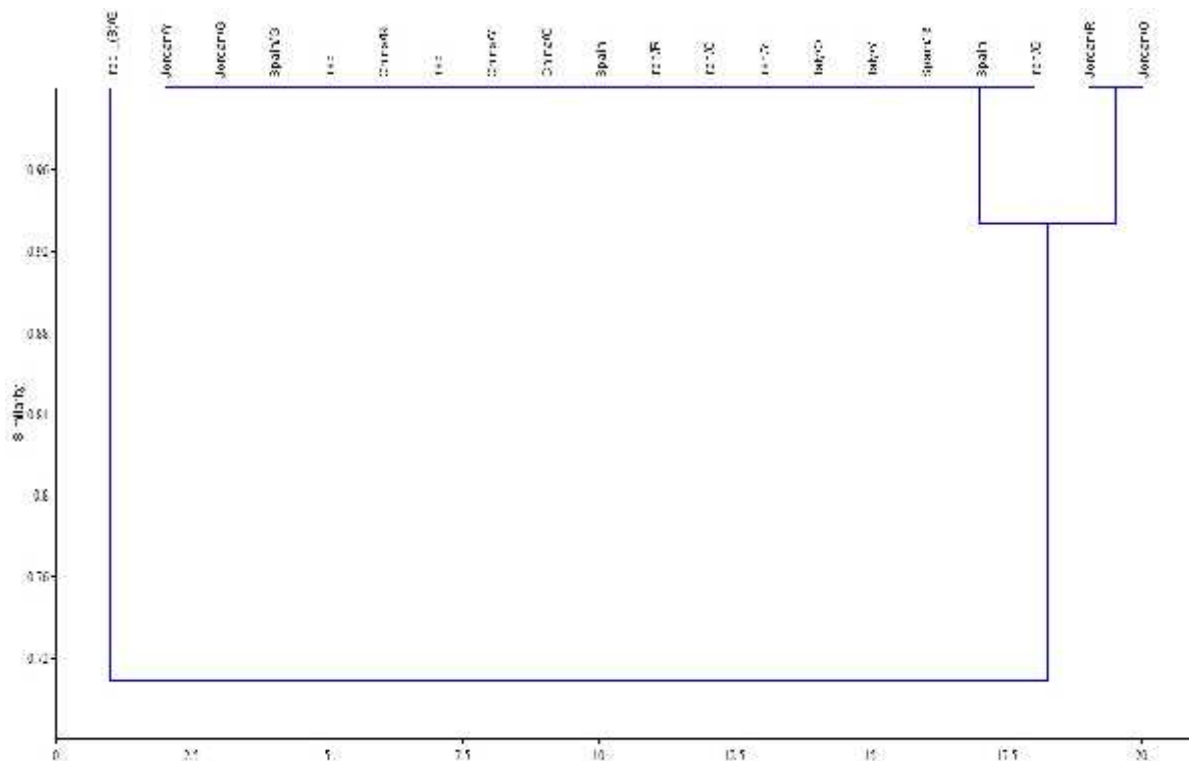
❖ DNA sequencing في هذه الدراسة ❖

❖ و لجينات معينة ومقارنتها مع الجينوم الكامل للفلفل والمنشور في المواقع العالمية مثل

<http://www.dnabank-network.org>

<http://genome.ucsc.edu>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



Dendrogram (4-4): AFLP-PCR لعينات ثمار

Jaccard

(Tam *et al.*, 2005) بها AFLP SSR Sequence specific

amplification polymorphism (SSAP) في الكشف عن التغيرات الوراثي لخمسة

Bell pepper كانت نسبة التغيرات منخفضة

1432 AFLP %8.03

Limited genetic distance يوضح 115

SSAP

Long pepper

Bell pepper

.AFLP

Accession

جموعتين حسب خريطة القراءة الوراثية

255 حزمة ذات تعدد شكلي وهذا يعكس جهود المرين لتطوير واختيار

AFLP

(Wahyuni *et al.*, 2013).

تقدير التباين الوراثي فيما بينهم

ت فيها

956

AFLP

ي يبين القراءة الشديدة

تمايز ضعيف مما يشير

راضي المفتوحة والبيوت الزجاجية يعتمد مباشرة على مجموعة من الأ

دون تجديد وهذه النتيجة متوافقة مع نتائج (Aktas *et al.*, 2009 Paran *et al.*, 1998).

#### 4-1-2: قيم الأبعاد الوراثية بين عينات

#### AFLP-PCR

Past قدر البعد الوراثي بين عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة باستع

(4-) لى نسبة التشابه باستعمال معامل Euclidean coefficient

(2). على قيمة بعد وراثي بين عيني ثمار الفلفل الحلو الأردني الأحمر والبرتقالي وعينة

2.236 بينما كان قل بعد وراثي بين الكثير من عين

اكادت هذه

### التربية الحديثة للنباتات Modren breeding

الحديثة Modren varieties (Vellve, 1993) وهذا ما بينه (Paran *et al.*, 1998)

على نسبة منخفضة للتعدد الشكلي (تقريباً 13%) AFLP

شجرة القرية الوراثية المبنية على نتائج هذه الدراسة انفصلت ثمار الفلفل الحلو الجرسى كبيرة الحجم ذات

غيرية الحجم الحارة ذات التنوع الأ

(Lefebvre *et al.*, 1993 ; Lefebvre *et al.*, 2001 ; Tam *et al.*, 2005)

### SSR-PCR :2-4

التغاير SSR-PCR وباستعمال ستة بواى في جميع العينات.

33 حزمة في جميع العينات انتج منها البادى الأ EPMS-342

عينات الفلفل المدروسة ويعدد Monomorphic bands في كل عينة 3

Polymorphic bands %42.86 %44.45

فعالية تميزة بنسبة 12.5% ( 5-4 3-4). لبادى EPMS-397

في كل عينة كانت جميعها متباينة هذه الحزم 100%

كفاءة التوافق 0% مع قوة فعالية تميزة بنسبة 16.7% ( 6-4 -4

(3).

## Results and Discussion

: ٤

AFLP-PCR

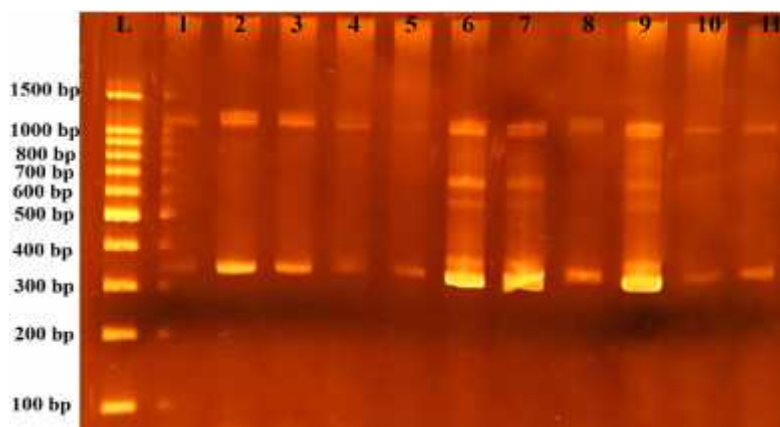
راثية لعينا : (2-4)

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/O	Italy/Y	Spain/R	Spain (L)/R	Iran/G
Jordan/O	0																			
Jordan/R	0	0																		
Jordan/Y	1	1	0																	
Jordan/G	1	1	0	0																
Spain/G	1	1	0	0	0															
Iraqi (B)/G	2.236	2.236	2	2	2	0														
Iraqi (Y)/G	1	1	0	0	0	2	0													
China/R	1	1	0	0	0	2	0	0												
Iraqi (S)/G	1	1	0	0	0	2	0	0	0											
China/Y	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0										
China/O	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0									
Spain (L)/G	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0								
Iran/R	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0							
Iran/O	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0						
Iran/Y	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
Italy/O	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Italy/Y	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Spain/R	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Spain (L)/R	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Iran/G	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

على قيمة بعد وراثي



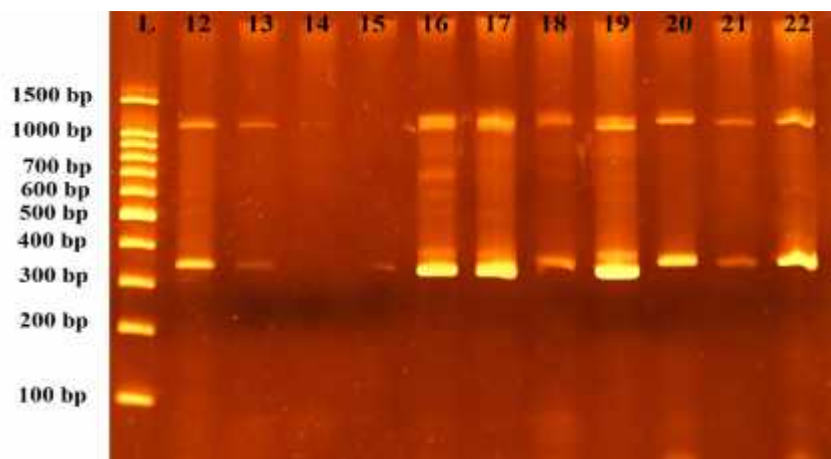
- ١١ : EPMS-426 سيع حزم في عينات الفلفل المدروسة ويعد حزمتين ١١
- Monomorphic bands في كل عينة و5 ١١ Polymorphic bands ١١
- ١١ 71.43% ١١ 22.22% مع قوة فعالية تميزية بنسبة 20.8% ( ١١ 7-4
- ١١ (3-4)، بينما انتج البادئ الرابع EPMS-501 ست حزم في عينات الفلفل المدروسة ويعد ثلاثة ١١
- Monomorphic bands في كل عينة و3 ١١ Polymorphic bands ١١
- ١١ 50% ١١ 33.33% مع قوة فعالية تميزية بـ ١١ 12.5% ( ١١ 8-4
- ١١ (3-4) ١١ GPMS-290 حزم في عينات الفلفل المدروسة كانت جميعها متباينة ١١
- ١١ هذه الحزم 100% ١١
- ١١ مع قوة فعالية تميزية بنسبة 16.7% ( ١١ 9-4 ١١ (3-4). انتج البادئ السادس-GPMS
- ١١ 161 حزم في عينات الفلفل المدروسة كانت جميعها متباينة الشكل ١١ هذه الحزم
- ١١ 100% ١١ 0% مع قوة فعالية تميزية بنسبة 20.8%
- ١١ ( ١١ 10-4 ١١ (3-4) علماً بأنه قد كان عدد الحزم الكلية الناتجة في جميع عينات الفلفل 495
- ١١ حزمة كان جميعها ذ ١١ يتراوح بين 100 ١١ 1500 .



EPMS-342 (5-4): الترحيل الكهربائي  
SSR-PCR

L: ليل الـ (1500) :1 / :5 :4  
:3 :2 :6 :9 :8  
:7 :فلل عراقي/بوسفية  
:11 :فلل صيني  
:10 :فلل صيني

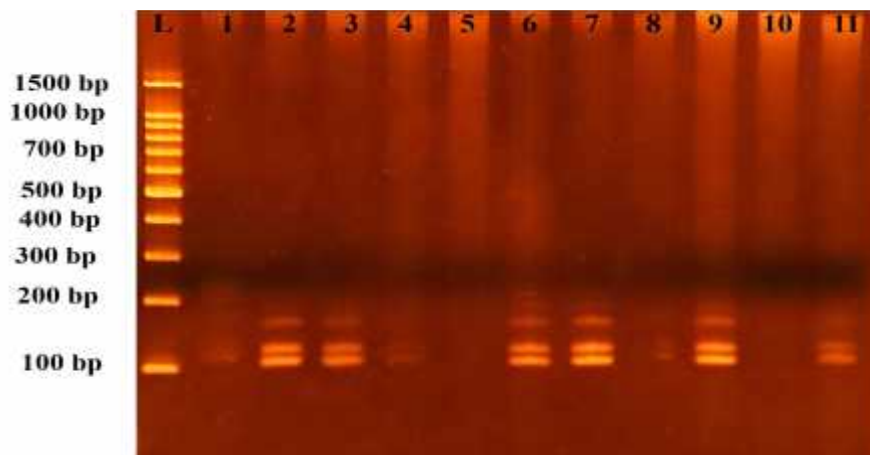
(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلمايد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



EPMS-342 (5-4): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الـ  
SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14  
:18 :17 :16 :15 :19  
:22 :21 :20 :12 :13  
:18 :17 :16 :15 :19  
:22 :21 :20 :12 :13

(رحلت العينات باستعمال هلام البولي اكريلمايد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



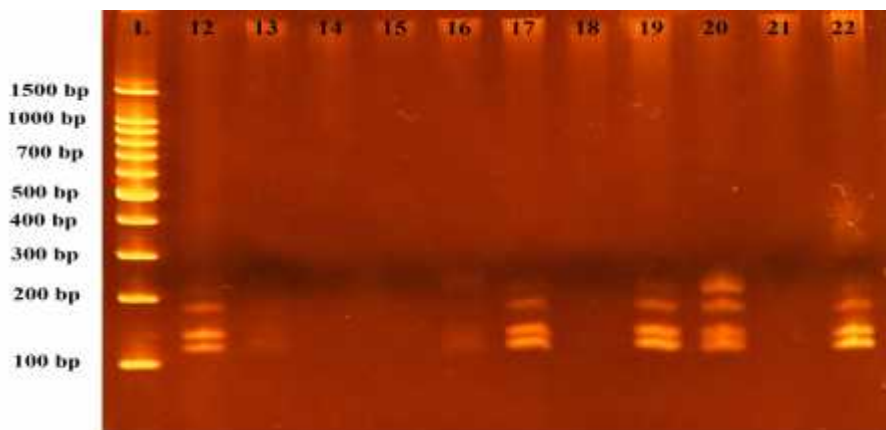
(4-6): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ EPMS-397

SSR-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12

فلفل صيني / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي / فلفل صيني برتقالي

(رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



(4-6): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ EPMS-397

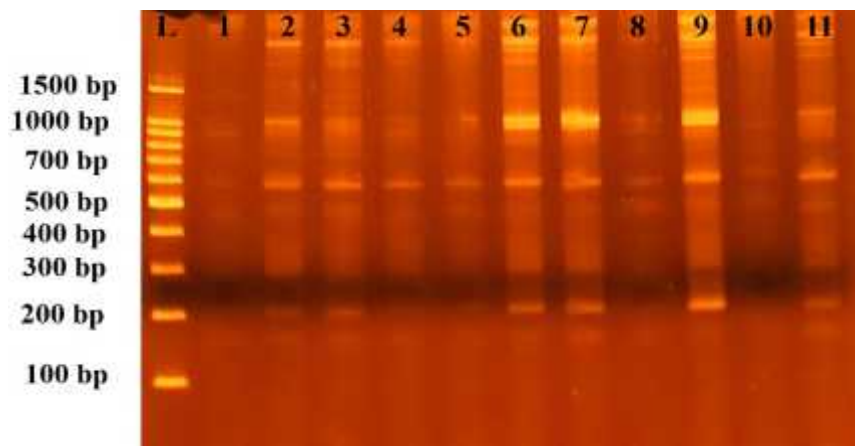
SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني برتقالي، يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني

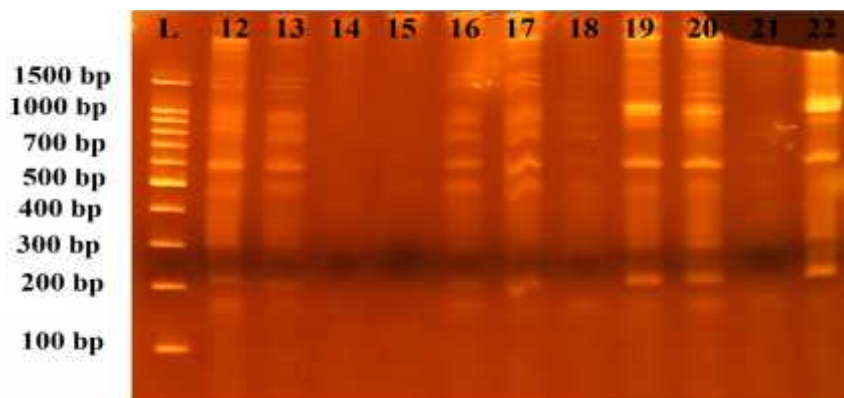
(رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)





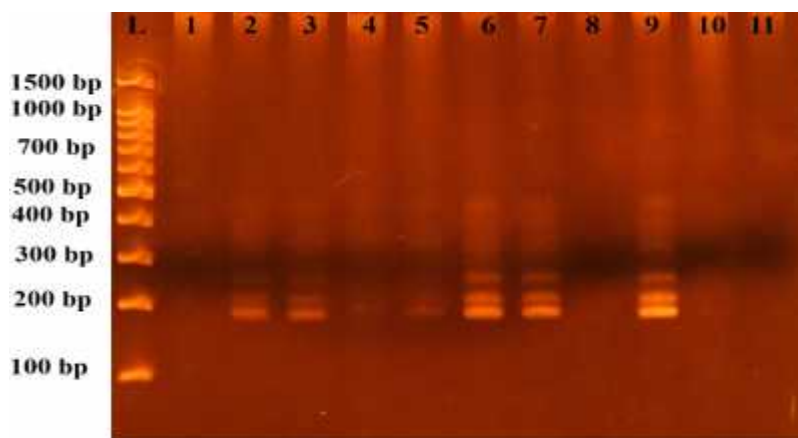
(7-4): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ EPMS-426  
SSR-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12  
 فلفل صيني / فلفل صيني برتقالي / راقبي / يوسفية / فلفل صيني برتقالي  
 (رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



(7-4): الترحيل الكهربائي  
SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22  
 يراني برتقالي، يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني / يراني  
 (رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

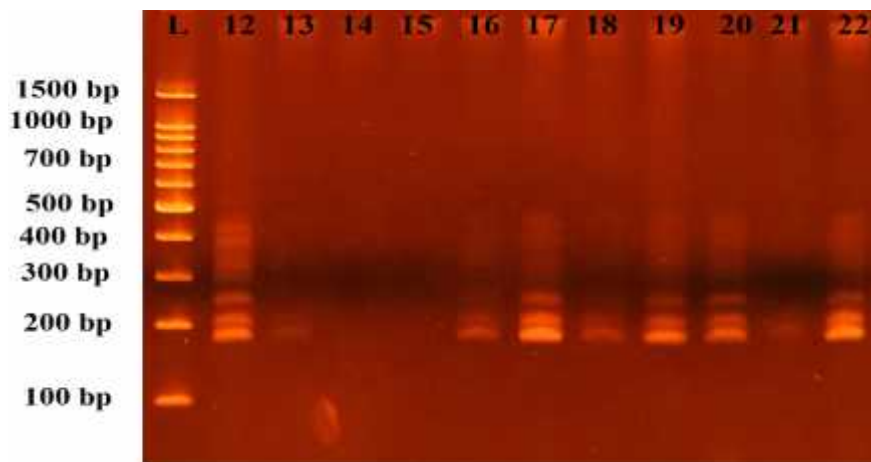


(8-4): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ EPMS-501

SSR-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

فلفل صيني / فلفل صيني برتقالي . (رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



(8-4): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ EPMS-501

SSR-PCR

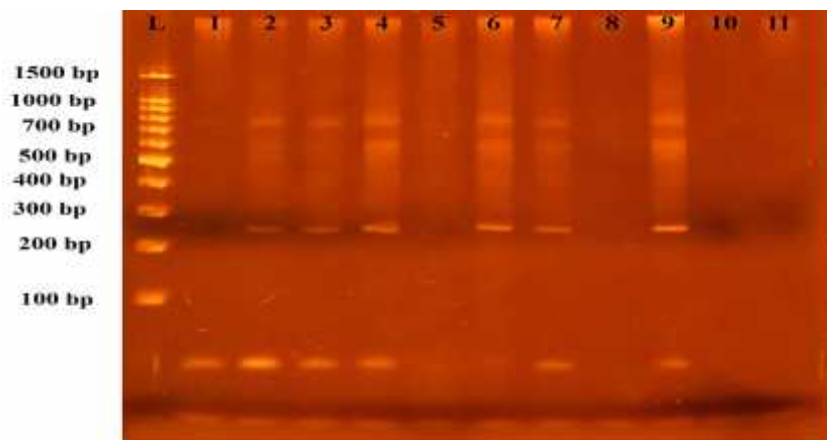
L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني برتقالي، :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

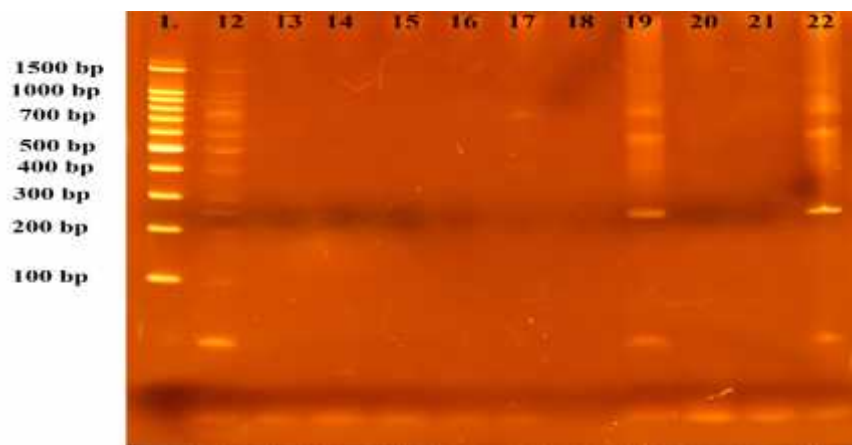




(10): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ GPMS-161

SSR-PCR

L: الدليل الـ (1500) :1 / :2 :3 :4  
 فلفل صيني :5 :6 :7 :8  
 فلفل صيني برتقالي :9 :10 :11  
 (رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



(10): الترحيل الكهربائي باستخدام الـ GPMS-161

SSR-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14  
 يراني برتقالي، :15 :16 :17 :18  
 يراني :19 :20 :21 :22  
 (رحلت العينات باستخدام هلام البولي اكريلاميد بتركيز 6%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

٤١ في عينه SSR-PCR : (3-4)

التمييزية (%)	بين البوادي (%)	٤١ (%)	٤١	٤١	٤١
12.5	44.45	42.86	3	4	EPMS-342
16.7	0	100	4	0	EPMS-397
20.8	22.22	71.43	5	2	EPMS-426
12.5	33.33	50	3	3	EPMS-501
16.7	0	100	4	0	GPMS-29
20.8	0	100	5	0	GPMS-161
100	100	-	24	9	

٤١ Epms-342 (Nagy et al., 2007)

٤١ Epms-397 وارب حزم متعددة للبادي Epms-426

Gpms-29 Epms-501 وخمسة حزم للبادي Gpms161 (Nicolai et al., 2013)

٤١ Epms397 اليا والبادي Epms426 اليا والبادي Epms342 اليا والبادي

Gpms161 اليا والبادي Gpms29 اليا وهذا ايضا مخالف لعدد الأليات الناتجة في

الحالية وقد يرجع السبب في الكشف عن ناتج تضخيم هذه اليا

الجينية للفلل المستعملة في الدراسات المذكورة. قدر تغاير Accessions SSR

Crop research Institute, Prague-Ruzyne, Department of vegetables

Accession 41 and special crops in Olomouc وباستعمال ثمانية

Uniform spectra (ليل واحد فقط)

من هذه Hpms 1-274 Hpms 1-1 Hpms 1-168

8-2 ليل ومجموع 28 ليل تم تقصيه و ط 3.5 ليل في كل موقع. بينت

الخارطة الوراثية المبنية على نتائج هذه الدراسة تشابهاً عالياً بين

(Rodrigues and Tam, 2010) (Haná ek et al., 2009)

SSR *Capsicum frutescens* والمزروعة في ماليزيا. استعملت عشر

جزئية متعددة الأشكال تم تطبيقها في تحديد مستويات لتغاير راثي ضمن المجموعة قيد الدراسة،

Heterozygotes غيرالمتماثلة جينياً السكانية أكملها، مما يشير

Inbreeding فيما بينها وأن تقدير

التغاير الوراثي ال مستزرع ضمن منطقة جغرافية يمكن

اعتماد المزارعين التقليديين على البذور من الضروب الط نتائج محاصيلهم، وقد بين (Ince et al.,

2010) 45 SSR

اليطا، البانجان والتغ. قد ضخمت مجين كل من: *Capsicum*

*C. grutescens. C. chinense. C. baccatum. C. chacoense annum*

*pebescens*، مما يشير لى امكانية استعمال هذه *Capsicum*

النيوكليوتيدات، بينما التعدد الشكلي الأكثر على مستون ضمن النوع Intraspesific يكون بتكرارات ثلاثية

النيوكليوتيدات، (Oh et al., 2012) SSR

في تقييم وتحديد التغاير الوراثي وحفظ مصادر المادة الوراثية للفلل ا 22

82 قطعة مضخمة ذات تعدد شكلي ومستوى واطئ Accessions 61 SSR

التغاير الوراثي بين نموات الفلفل. ودراسة التباين والتشخيص الجزيئي لا Chili pepper

27 ي 64 SSR

55 متعددة الأشكال ومجموع 75 ليل و ط 2.78 ليل في كل موقع والخارطة العنقودية قد

منفردة عن بعضها البعض (Dhaliwal et al., 2014) SSR ك

دراسة هؤلاء الباحثين من التفريق بين Pepsi 8-1 Tabasco PAUSel long Pls2

الباحثون هذه الحالة

المستعملة غير كافية لتقصي الفروقات بين هذين الزوجين من الأنماط الوراثية او لمحدودية التقانة

Technological limitations (Rai et al., 2013) فقد اوضح نسبة التعدد الشكلي

ط 25 ك 102 في المادة الوراثية للفلفل بعد استعماله لاكثر من

تعدد شكلي بعد فحصه لسته انماط وراثية للفلفل. ان اختلاف عدد الأليات الناتجة من تضخيم بادئات

SSR المتشابهة بين باحث وآخر ظهر عند (Minamiyama et al., 2006) ك

ط 163 ك 647 Cams هو عشر اليات، بينما في دراسة

(Haná ek et al., 2009) ط 163 اليين فقط والبادئ Cams647 ط.

4-2-1: مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة)

SSR-PCR

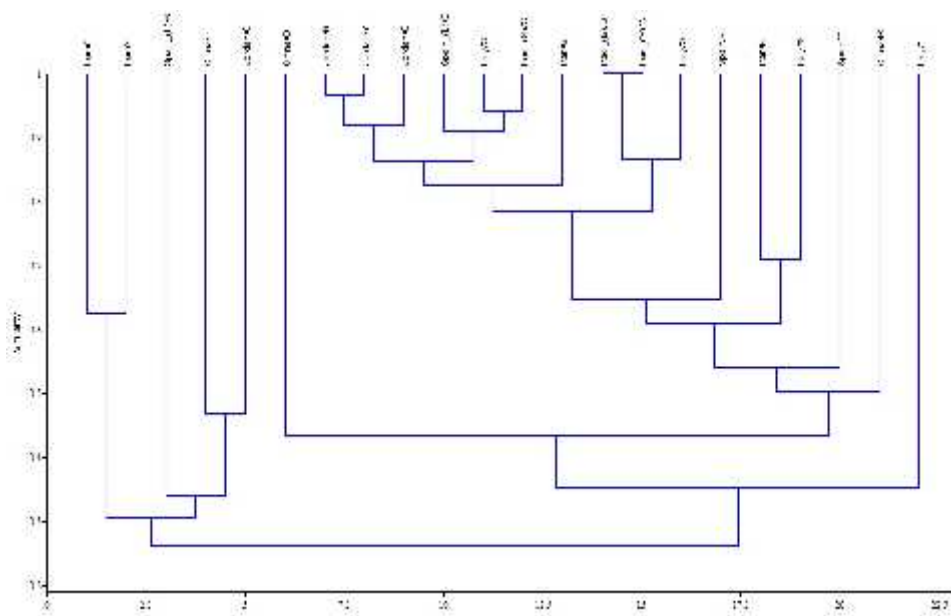
SSR-

PCR عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة وباستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي. يتضح من الشكل (4-11) بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي في مجاميع رئيسة. المجموعة الأولى ضمت

الأيراني البرتقالي والأصفر

لثة فضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني الأصفر

الصيني البرتقالي، بينما



SSR-PCR لعينات ثمار

Dendrogram

: (4-11)

Jaccard



الصيني الأحمر، بينما	
فضمت عينتي الفلفل الحلو الإيطالي الأحمر والأيرا	
ما المجموعة العاشرة والأخيرة	
	ثدي
والیوسفية، بينما ضمت	/
یراني الأخضر	
یطالي الأخضر، الأسباني الطویل الأخضر، والأردني الأخضر والأصفر والأحمر.	/
وضح هذا المخطط وجود تشابه عال بين ثمار الفلفل الحلو العراقي/ الیوسفية الأخضر	
ونسبة 1	لعينة الفلفل الأسباني الطویل الأخضر وقيمة
0.35	يضاً بين ثمار الفلفل الحلو ا
0.98	
0.94	وكذلك بين ثمار الفلفل الحلو /
(	لعراقي/بلد والیوسفية
0.88	یراني الأحمر قد ا
0.72	امیع الرئيسة الثلاثة الأولى قد اظهرت تشابهاً بعيداً عن العينات الأخرى وقيمة 0.26.
	جرت لغرض تحديد وتقييم فعالية SSRs
Distinctiveness, Uniformity,	ختيار التميز
Polymorphic	SSR 27
	stability (DUS)
89 ليلاً، وباستعمال التحليل العنقودي	نتجت هذه 66

Cluster analysis لي ثلاثة مجاميع رئيسية، ولقد لوحظ عدم وجود علاقة معنوية

بين المعلومات المظهرية ومعلومات SSR (Kwon et al., 2005) (Nagy et al., 2007)

مجموعة جديدة من 168000 *Capsicum annuum* SSR

الجين 23174 Genomic clones Public database والتي يمكن استعمالها في

تصميم البادئ وعند 411 Microsatellite containing

154 sequences من SSR من المكتبات الجينية و257

147 (61) من المكتبات الجينية و86

شكل بين 2- 33 ط ، وقد ظهرت فائدة هذه ا

الجديدة من خلال رسم شجرة القرابة التي بنيت Microsatellite، وتبين

استعمال هذه Solanaceae. كما بين الباحث

يأن شجرة القرابة المبنية لي ان ثمار الفلفل الصغيرة والمستوردة من خارج هنكاريًا قد وضعت في مجموعة

ذات الثمار الكبيرة، كذلك انفصلت ط كارب

(البابريكا) عن الخطوط التجارية للفلفل، بينما (Sonnante and Pignone, 2007)

ما بين التشابه الوراثي والبعد الجغرافي للتراكيب الاصلية ليس واضحاً بصورة دائمية. اما (Tam et al.,

2009) فقد بينوا الأساس الوراثي الضيق للفلفل الحلو الكبير مقارنة مع النيات الاصلية Exotic

landraces Accessions 64 SSAP

لي الهجرة المتعددة لأنماط الفلفل عن طرق المزارعين وتبني البلدان الجديدة لهذه

ط بعد استقرارها في المنطقة. لأجل تحديد التغيرات في

ختيار المجموعات المشتركة Co-collections

SSR 28 89

تبين ظهور ستة مجاميع عنقودية Clusters لرئيسي ضمنها النوع ا

والأقارب البرية حسب التصنيف Taxonomic classification، وثلاثة مجاميع اضافية للفلفل

*C. annuum*، حددت العلاقة بين انواع الفلفل المستزرعة والنوع البري للجنس *C. annuum*

SSR (Rai et al., 2013). (Nicolai et al., 2013) var. *glabriusculum*

Random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) في تحليل التنوع

الوراثي والعلاقات بين 48 *Capsicum* spp. 106

RAMP 25 76 17

87 قطعة متعددة الأشكال ساعدت في بناء خرائط القراية المبنية على معلومات كلا الواصمين. بينت

النتائج ظهور مجموعتين *C. annuum* ط، بينما كانت الأجناس *C. chinense* *C. frutescens* *baccatum*

ن التغاير ضمن الأنماط التي

*C. annuum* كبر من التغاير في جنس *C. annuum*.

#### 4-2-2: قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو SSR-PCR

قدر الـعد الوراثي بين عينات ثمار ا Past  
 اعتماداً على نسبة التشابه باستعمال معامل أحصائي هو Euclidean coefficient (4-)  
 (4). على قيمة عد وراثي بين عيني ثمار الفلفل /  
 عينة الفلفل الإيراني البرتقالي 5.656، بينما كان قل عد وراثي بين عيني  
 عراقي/يوسفية إذ كانت القيمة مساوية 1.0. بقية عينات ثمار  
 يعادها الوراثية بين 1.0 5.656.

ن الآف السنين من الانتخاب الصناعي في البيئات ي لى ظهور طفرات جديدة  
 وتوافقات الـلية Allele combination ذات اهمية زراعية (Nicolai et al., 2013). يكون التغير  
 الجيني بين انماط الفلفل *C. annuum* قليلاً في الأنماط البرية وشبه البرية وهذا متوقع لأد  
 كل انواع المحاصيل تقريباً انخفاضاً في التنوع الجيني (Gepts, 2004 ; Oyama et al.,  
 2006) ن سبب صعوبة التفريق بين الأصناف التجارية Commercial pepper  
 varieties لى تنوعها الجيني الواطئ الناتج عن التعدد الشكلي الجزئي المنخفض (Lefebvre et  
 al., 2001 ; Kwon et al., 2005) نتخاب المستمر لخطوط الترية ذات الصفات المرغوبة تجارياً  
 لى تضييق التنوع الوراثي في العديد من انواع المحاصيل (Ince et al., 2009) وهذا ما اكده (Ortiz  
 et al., 2010) عندما بينوا ان التغير في ثمار الفلفل الحلو اضيق من التغير في ثمار الفلفل الحار Chili  
 ة فقدت تبايرها الجيني عند بدء عملية الـ أ هجرة هذه

## Results and Discussion

: ٤

### SSR-PCR راثية لعينات الفلفل المستوردة : (4-4)

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 (L)/R	Iran/G	
Jordan/O	0																						
Jordan/R	3.873	0																					
Jordan/Y	4	1	0																				
Jordan/G	3.605	1.414	1.732	0																			
Spain/G	3.873	3.464	3.605	3.162	0																		
Iraqi (B)/G	4.690	2.645	2.449	3	4.358	0																	
Iraqi (Y)/G	4.690	2.645	2.449	3	4.358	0	0																
China/R	3.464	4.123	4.242	3.873	3.873	4	4	0															
Iraqi (S)/G	4.242	1.732	1.414	2.236	3.873	2	2	4.472	0														
China/Y	2.828	4.795	4.899	4.582	3.316	5.477	5.477	3.741	5.099	0													
China/O	3.741	4.123	4.242	4.123	3.316	4.690	4.690	3.464	4.242	2.828	0												
Spain (L)/G	4.358	2.449	2.236	2.828	3.741	2.645	2.645	4.582	1.732	5	4.123	0											
Iran/R	3.605	3.464	3.316	3.162	3.464	4.123	4.123	3	3.605	3.873	3.605	3.464	0										
Iran/O	3.464	5	5.099	4.795	4.123	5.656	5.656	4	5.291	2.449	3.741	5.196	3.873	0									
Iran/Y	3.316	4.690	4.795	4.472	4.472	5.385	5.385	3.873	5	3	4.123	4.899	3.464	1.732	0								
Italy/R	3.741	3.316	3.162	3.316	3.316	4	4	4	3.464	4	4.242	3	2.645	4.242	3.873	0							
Italy/O	4.795	3.162	3	3.464	4.242	2.236	2.236	3.605	3	5.196	4.582	2.828	3.464	5.196	4.899	3.316	0						
Italy/Y	4	4.795	4.899	4.795	4.358	4.690	4.690	3.464	5.099	3.464	4.472	5	3.873	3.464	3.605	4	4.123	0					
Italy/G	4.242	1.732	2	2.236	3.873	2.449	2.449	4.472	1.414	5.099	4.242	1.732	3.605	5.099	4.795	3.464	3	4.899	0				
Spain/R	5.196	4	3.873	4.242	3.741	3	3	3.873	3.605	4.795	3.873	3.464	4	5	5.291	3.873	2.449	4.123	3.605	0			
Spain (L)/R	3.605	4.899	5	4.690	3.464	5.567	5.567	4.358	5.196	2.236	3.605	4.899	3.741	2.236	2.828	3.873	5.099	3.316	5	4.690	0		
Iran/G	3.741	2.236	2.449	2.645	3.873	3.162	3.162	4.690	2.449	4.690	4.472	2.236	3.873	4.899	4.582	2.828	3.316	4.690	2	4.123	4.582	0	

على قيمة بعد وراثي	
قل قيمة بعد وراثي	

(Tang *et al.*, 2010). تشير النتائج لانواع

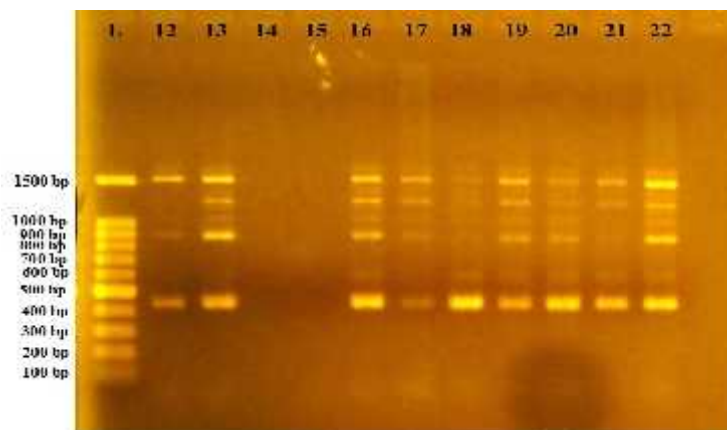
الفلفل المكسيكي البري والملى تغاير وراثي عالي بين وضمن *C. annuum* ك  
السابقة في المكسيك التي اجريت على عينات ماخوذة من بنك المادة الوراثية Germplasm bank  
انخفاض طفيف

التدجين التغاير الجيني (Pacheco-Olvera *et al.*, :  
.2012)

### 3-4: RAPD-PCR

بواى في التضخيم العشوائي لدينا متعدد ك لغرض تعيين التغاير  
لو للعينات المحلية والمستوردة في العراق. نتجت الابدات المستعملة في هذه الدراسة 292  
OPB-01 81 حزمة تاى 6-2 ؛ تراوح بين 1500  
450 ي ك نتجت من عينة ثمار الفلفل الحلو الصيني  
البرتقالي، بينما عينات ثمار الفلفل الحلو الأردني البرتقالي، الأسياني الأخضر، العراقي/بلد الأخضر،  
الصيني الأحمر والأصفر والأيراني البرتقال  
نسبة التعدد الشكلي لهذا اى 100% ي ي حزم متميزة (شكل 4-12)  
(5-4).



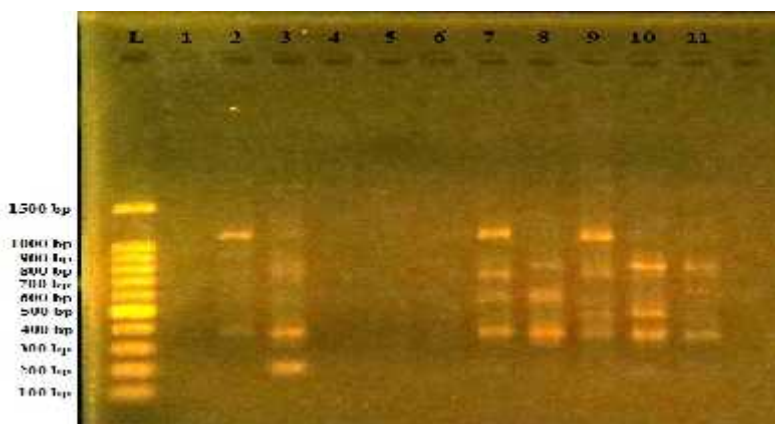


ك (4-12): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الـ OPB-01

RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) يراني  
 12 ( سباني طويل :13 يراني  
 15 يراني :16  
 17 :18  
 19 :20  
 21 :22 يراني

(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



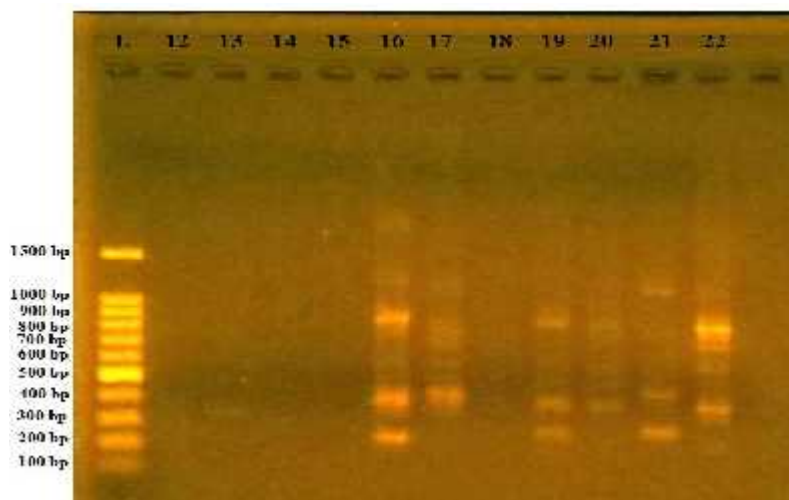
ك (4-13): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الـ OPB-12

RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) يراني  
 1 ( :2  
 3 :4  
 5 :6  
 7 :8  
 9 :10  
 11 :12  
 13 :14  
 15 :16  
 17 :18  
 19 :20  
 21 :22  
 23 :24  
 25 :26  
 27 :28  
 29 :30  
 31 :32  
 33 :34  
 35 :36  
 37 :38  
 39 :40  
 41 :42  
 43 :44  
 45 :46  
 47 :48  
 49 :50  
 51 :52  
 53 :54  
 55 :56  
 57 :58  
 59 :60  
 61 :62  
 63 :64  
 65 :66  
 67 :68  
 69 :70  
 71 :72  
 73 :74  
 75 :76  
 77 :78  
 79 :80  
 81 :82  
 83 :84  
 85 :86  
 87 :88  
 89 :90  
 91 :92  
 93 :94  
 95 :96  
 97 :98  
 99 :100

(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)





OPB-12 (4-13): الترحيل الكهربائي  
RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) يراني بر  
:12 ( :13 يراني :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22 يراني

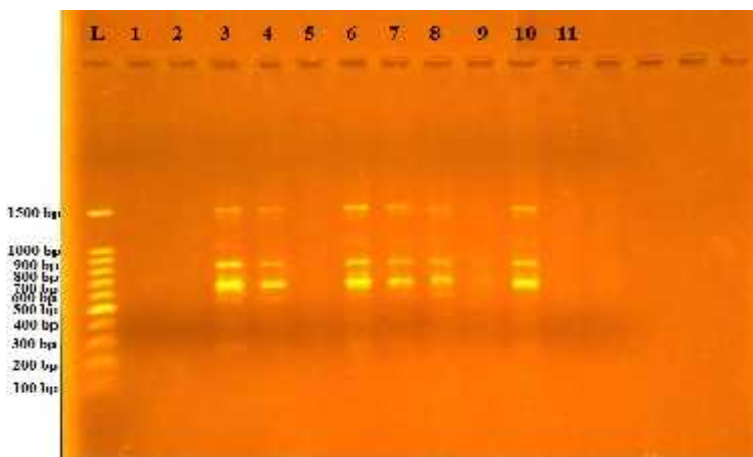
(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

(4-5): نواتج الحزم المتعددة الأشكال والنسبة المئوية للتعدد الشكلي

البيانات	النتيجة	النسبة المئوية للتعدد الشكلي (%)	رقم العينة
6	6	100	OPB-01 1
6	6	100	OPB-12 2
6	6	100	OPB-15 3
8	8	100	C43 4
4	4	100	C52 5



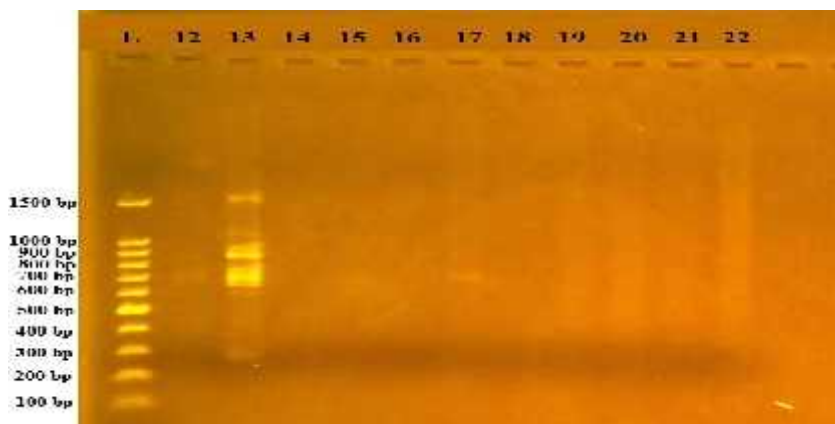




OPB-15 (4-14): الترحيل الكهربائي

RAPD-PCR

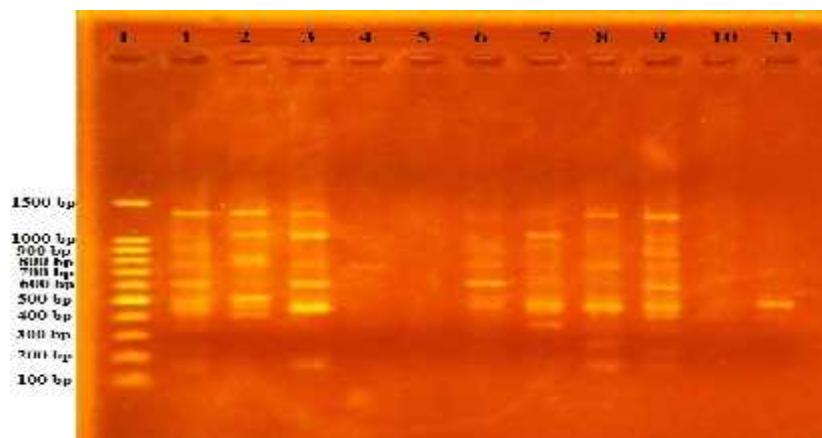
L: الدليل الحجمي (1500)  
 1: ( / 5: فلفل صيني  
 2: / 6: فلفل صيني برتقالي  
 3: 7: فلفل عراقي/يوسفية  
 8: 11: فلفل صيني برتقالي  
 9: 10: يني  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



OPB-15 (4-14): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستعمال الـ OPB-15

RAPD-PCR

L: يل الحجمي (1500)  
 12: ( / 15: يراني بر  
 13: / 16: يراني  
 14: 17: سياني طوي  
 18: 20: يراني  
 21: 22: يراني  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



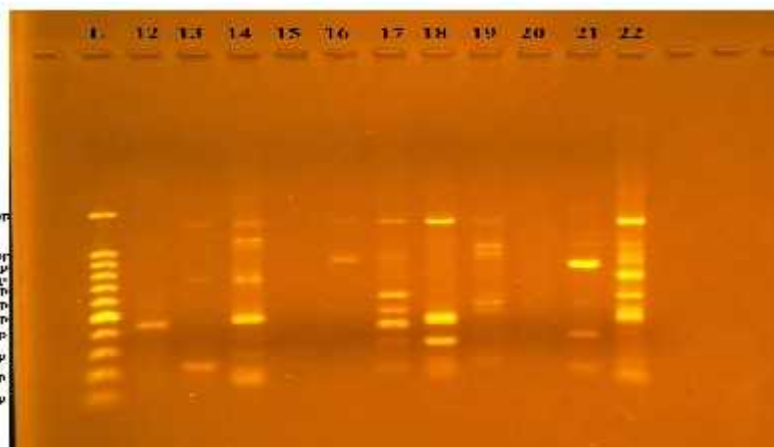
ك (4-15): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ C43

RAPD-PCR

L: الدليل الح (1500) :1 ( :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

فلفل صيني :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستخدام هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



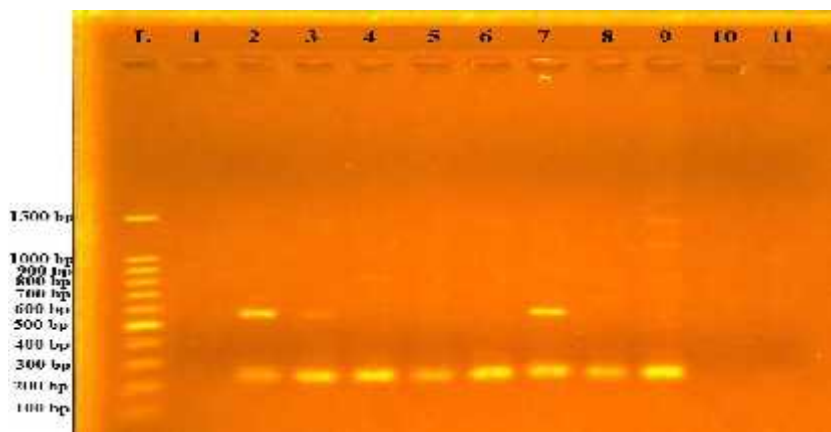
ك (4-15): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ C43

RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني بر :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستخدام هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-16): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ C52

RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :1 ( :2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

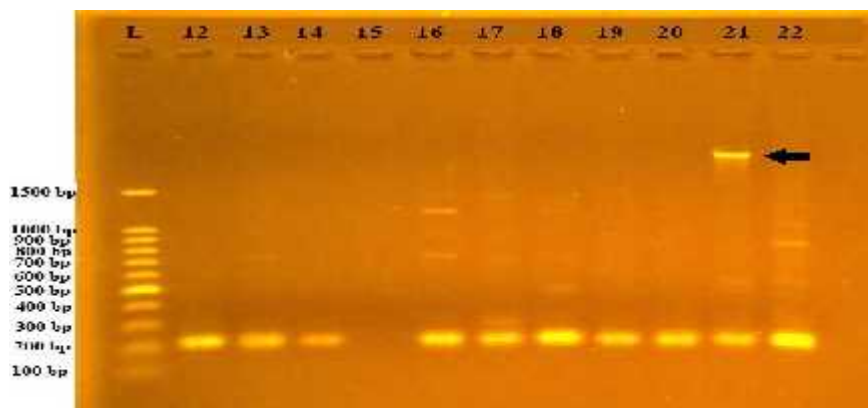
فلفل صيني :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

فلفل صيني / :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

فلفل صيني / يوسفية :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

فلفل صيني / فلفل صيني برتقالي :8 :9 :10 :11 :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستخدام هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-16): الترحيل الكهربائي لدنا ثمار الفلفل الحلو باستخدام الـ C52

RAPD-PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :12 ( :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني بر :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

يراني :12 :13 :14 :15 :16 :17 :18 :19 :20 :21 :22

(رحلت العينات باستخدام هلام بتركيز 1.5%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

نتجت هذه البادئات المتعدد 5 : 63 : 391 بُي لها يتباين من

2754 5 35 28 Monomorphic bands 5 ١١

حزمة متعددة الأشكال مع نسبة مئوية للتعدد الشكلي كان 44.4%. 5

البادئات العشوائية المستعملة يتراوح من 5 9 OPB-10 ١١ 9 OPB-01 ١١ 9 OPB-

15 ط 7 حزم لكل بادئ، كما كانت نسبة الحزم المتعددة الأشكال تتباين 14.29 66.7%.

(da- Costa et al., 2006) يجاد التباين لوراثي بين مستزعات

الفلفل الحلو يستعمل الواصم الجزئي العشوائي RAPD ١١ ١١ هناك تباينات وراثية

ضمن وبين ن هذه النتائج كانت متوافقة مع التصنيفات النباتية والمظهرية-

.Botanical and morpho-agronomic classification ١١

#### 4-3-1: مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة)

#### RAPD-PCR

١١ ١١ اعتماداً على النتائج المتحصلة من البادئات العشوائية ويا

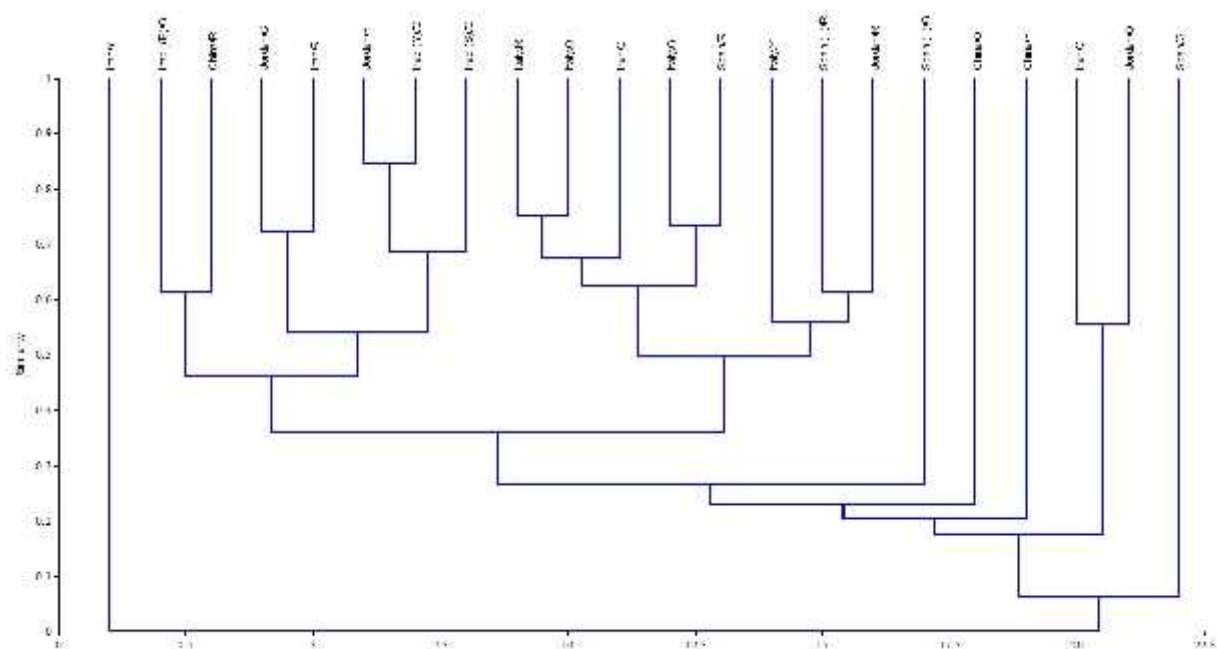
RAPD-PCR على عينات ثمار الفلفل الحلو المدروسة واستعمال مقياس Jaccard ١١

يتضح من الشكل (4-17) بأن العينات قد توزعت ضمن التحليل العنقودي في ثمان مجاميع رئيسية.

الفلفل الحلو الآسياني الأخضر والمجموعة الثانية تكونت من تحت مجموعة

الأردني والآيراني البرتقالي،

الصيني الأصفر والمجموعة الرابعة ضمت ثمار الفلفل الحلو الصيني البرتقالي.



Dendrogram (17-4) :  
 RAPD-PCR لعينات ثمار الفلفل  
 Jaccard

المجموعة الخامسة ضمت ثمار الفلفل الحلو الآسياني الطويل الأخضر، بينما تك  
 ثنين من تحت المجموعة ضمت

الآسياني الأحمر والأيطالي الأخضر والبرتقالي والأحمر والأيراند

ثلاث تحت المجموعة. ضمت تحت المجموعة الأولى ثمار الفلفل الحلو العراقي/الصويرة واليوسفية الأخذ  
 والأردني الأصفر، بينما ضمت تحت المجموعة الثانية ثمار الفلفل الحلو الأيراني الأحمر والأردني الأخضر،





4-3-2: قيم الأبعاد الوراثية بين عينات ثمار الفلفل الحلو  
**RAPD-PCR**

Past قدر اليعد الوراثي بين عينات ثمار الفلفل الحلو

-4) Euclidean coefficient

(6). على قيمة يعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو الصيني الأصفر والإيراني

الأخضر وقيمة 5.0، بينما كان قل يعد وراثي بين عينتي ثمار الفلفل الحلو الأ

الأيراني  
ذ كانت القيمة مساوية 1.0. بقية عينات ثمار الفلفل

الوراثية بين 1.0 5.0. وضحت هذه النتائج

## Results and Discussion

: ١١

(4-6): قيم الأبعاد الوراثية لعينات الفلفل المستوردة بأعداد نتائج تقانة الدنا متعدد الأشكال مضخم عشوائياً RAPD-PCR

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 (L)/R	Iran/G	
Jordan/O	0																						
Jordan/R	3.464	0																					
Jordan/Y	4.359	3	0																				
Jordan/G	4.472	3.742	3.317	0																			
Spain/G	2.828	3.742	4.796	3.742	0																		
Iraqi (B)/G	3.162	4	3.606	3.162	3.162	0																	
Iraqi (Y)/G	4.359	3	2	3.317	4.796	3.606	0																
China/R	3.317	4.359	3.464	4.123	4.123	2.646	3.162	0															
Iraqi (S)/G	4.359	3.317	2.828	3.606	4.796	4.123	3.162	3.742	0														
China/Y	4.123	4.796	4	3.606	3.317	3	4.243	3.464	4.690	0													
China/O	3	3.317	4.243	4.123	2.646	3.606	4.243	4	4.243	3.464	0												
Spain (L)/G	3.317	3.317	4.243	3	2.236	3.317	4.243	4.243	4.472	3.742	2.828	0											
Iran/R	4.359	3.873	3.464	2.236	3.873	3	3.464	3.742	3.464	3.742	4	3.464	0										
Iran/O	2	3.464	4.359	4.243	2.450	3.162	4.583	3.317	4.123	4.123	3.317	3	3.873	0									
Iran/Y	2.646	3.873	4.899	3.873	1	3.317	4.899	4.243	4.899	3.162	2.450	2.450	4	2.646	0								
Italy/R	4.472	3.162	3.873	4	4	4.690	3.873	4.796	3.606	4.359	3.606	3.873	4.123	4.472	4.123	0							
Italy/O	4.359	3.317	4	3.873	4.123	4.583	3.464	4.243	3.742	4.472	3.742	3.742	3.742	4.359	4.243	2.236	0						
Italy/Y	3.873	2.646	4	3.317	3.317	4.123	4	4.690	3.742	4.690	3.464	3.162	3.162	3.606	3.464	3	2.828	0					
Italy/G	4.243	3.162	3.873	3.742	3.742	4.472	3.873	4.359	3.873	4.123	3.606	3.317	3.873	3.742	3.873	2.450	2.646	3	0				
Spain/R	4.243	3.162	4.123	3.464	3.162	4.472	3.873	4.583	4.123	3.873	3	3	3.873	4	3.317	2.450	2.646	3	2	0			
Spain (L)/R	4.123	2.646	3.742	3.873	3.606	4.359	4	4.690	3.742	4.472	3.464	3.162	4.243	3.873	3.742	3.317	3.464	2.828	3	3.317	0		
Iran/G	4	3.162	3.873	4.243	4.472	4.690	3.606	4.123	3.317	5	3.873	4.123	4.123	4	4.583	2.828	2.646	3	2.828	3.162	3.606	0	

على قيمة بعد وراثي	
قل قيمة بعد وراثي	

## 4-4: تقدير تراكيز البيتا-كاروتين -carotene في عينات الفلفل الحلو

قدر تراكيز البيتا-كاروتين كمياً ونوعياً في عينات الفلفل الحلو باستعمال تقانة (HPLC). نتج عن عملية الفصل رسم المنحني الخاص بالمرتب القياسي الذي ظهر عند زمن 3.743 . تبين في Chromatogram الخاص بكل عينة احتياض الخاص بالمحلول القياسي مما يدل على تواجد الصيغة في هذه المستخلصات. (7-4) تراكيز البيتا-كاروتين في عينات الفلفل الحلو المدروسة، إ ك على تراكيز قد قدر في عينة الفلفل 1415.73 مايكروغرام/مليتر بالمقارنة مع ا 94.32 مايكروغرام/مليتر في الفلفل الإيراني الأخضر. ك فل الأصفر في العينة الإيطالية وا ك في عينة يراني الأصفر وقيمة 710.89 مايكروغرام/مليتر، على تراكيز للبيتا-كاروتين للفلفل البرتقالي فكان في العينة الإيطالية وقيمة 898.5 مايكروغرام/مليتر 574.33 مايكروغرام/مليتر في الفلفل الإيراني البرتقالي. قل قيمة لتراكيز البيتا-كاروتين وهي 245.27 مايكروغرام/مليتر في عينة الفلفل الأردني الأحمر، بينما سجل الفلفل 435.41 مايكروغرام/مليتر. على قيمة في عينة يطالي الأخضر وقيمة 232.43 مايكروغرام/مليتر بالمقارنة مع قيمة 98.86 مايكروغرام/مليتر في عينة الفلفل ال / . المنحنيات الخاصة لعينات الفلفل المدروسة موضحة في الملحق (1).

\*HPLC (7-4): ترميز البيتا-كاروتين في عينات الفلفل الحلو المدروسة

ترميز البيتا-كاروتين (مايكروغرام/مليتر)		( )	التخفيف	نماذج العينة	
795.8	88613	3.793	10		1
245.27	27311	3.803	10		2
907.53	101052	3.800	10		3
182	28952	3.785	7		4
144.78	23030	3.787	7		5
135.15	15049	3.775	10	/	6
160.67	25558	3.787	7	فلفل عراقي/يوسفية	7
259.60	28906	3.785	10	فلفل صيني	8
98.86	11008	3.797	10	/	9
809.65	90154	3.800	10	فلفل صيني	10
887	98773	3.790	10	فلفل صيني	11
135.32	21526	3.793	7		12
336.71	37493	3.798	10	يراني	13
574.33	63951	3.805	10	يراني	14
710.89	52771	3.808	15	يراني	15
408.73	45512	3.788	10		16
898.5	100050	3.800	10		17
1415.73	105093	3.800	15		18
232.43	36973	3.787	7		19
435.41	48483	3.808	10		20
320.55	35693	3.800	10		21
94.32	10503	3.787	10	يراني	22

\* = 3.743 = 27837، ترميز العينة القياسية = 25 مايكروغرام/مليتر

(Matus *et al.*, 1991) بأن النسبة الاعلى للكاروتينات في ثمار الفلفل البرتقالية كانت

ليوتين Lutein بيتا-كاروتين -carotene

الاخضر غير (Deli *et al.*, 1996)

ليوتين Lutein بيتا-كاروتين -carotene ي

اية نسبة له في الفلفل الأ . وعند دراسة فلفل اليابركا الأ

rubrum بيتا-كاروتين -caroten ي ليويتين Lutein ي

تراكيز (Deli et al., 2001).

الكاروتينات بين الدراسات المختلفة يرجع الى اخت

Cultivars الكاروتينات (Zhang and Hauzu, 2003). كذلك الحال بالنسبة للباحثين (Marcela and

Amaya, 2003) ي التغيرات في النتائج يعود الى اختلاف ظروف التجربة Experimental

conditions وطريقة الاستخلاص وطبيعة جهاز HPLC مستعمل في الدراسة والمذيبات المختلفة في

Mobile phase كذلك وقت خزن الخضار والحرارة خلال عملية التحليل لها تأثير

كبير النتيجة. (Marin et al., 2004)

ليوتين Lutein بيتا-كاروتين -carotene ي ضج وغير

سبب هذه الفروقات بين تراكيز الكاروتينات ي التغيرات

الوظيفية والمظهرية والأبضية (اي ترتيب الصبغات ومحتواها خلال النضج) وهذه بدورها ناتجة من اختلاف

Post harvest handling (Howard et al., 2000 ; Marin et al., 2004 ; Conforti et

al., 2007 ; Matsufuji et al., 2007 ; Hallmann and Rembialkowska, 2012 ;

.Shotorbani et al., 2013)

(Lang *et al.*, 2004) البيتا-كاروتين -carotene

(Ha *et al.*, 2007) الذين بينوا

بيتا-كاروتين -carotene صفر الذي امتلك التريز الأ

علل الباحث سبب هذه الحالة ثين Capsanthin الكابسوروين Capsorubin

البيتا-كاروتين -carotene وهذه النتائج مشابهة لنتائج الدراسة

الحالية التي تشير ا البيتا-كاروتين -carotene صفر بمختلف مصادره ومن ثم

خضر الذي احتوى على التريز الأ . ان انواع ومستويات الكاروتينا

تختلف بين ثمار الفلفل التي بدورها تتأثر بالظروف البيئية واختلاف مراحل النضج الليوتين

Lutein خضر ثم ينحف الى ان يختفي في اللون الأ

الذي تزداد فيه صبغات الكابساثين Capsanthin الكابسوروين Capsorubin البيتا-كاروتين -

carotene فتقريباً كان ثابت المستوي خلال مراحل النمو والنضج (Gomez-Carcia and Ochoa-

Alejo, 2013). ان ترتيب المغذيات Nutrient component البيتا-كاروتين -carotene

Variety (Ahmad *et al.*, 2007 ; Ozgur *et al.*, 2011) وهذا ما اكده

(Shaha *et al.*, 2013) عند تفسيرهم الاختلاف بين عدة دراسات ثير نوع الترة المزروعة

فيها النباتات والظروف البيئية اثناء النمو وهذه ك كمية المرينات الفعالة حيوياً ك

( ) Bell pepper

على في محتوي الكاروتينا *C. annuum* var

*C. annuum* var *frutescens glabriusculum*. ان حساسية صبغات ثمار الفلفل للتأثيرات البيئية

كالمضوء ونقص الماء والحرارة العالية والرياح في الحقل كلها تؤثر المرئيات الحيوية مما يبين ان التحكم

ببيئة النمو يمكن (Keyhaninejad *et al.*, 2012).

(Nadeem *et al.*, 2011) كان فيها الفلفل الأ البيتا-كاروتين -

carotene بينما ك قل ترميزاً ك ه النسب

Torkel Mazurk من البيتا-كاروتين -carotene

Flamingo. بيتا-كاروتين -carotene

هو التجميد الذي يؤدي الى خفض ترميزه في العينات المجمدة كذلك وجد

عضوية كانت ذات محتو عال من البيتا-كاروتين -carotene

التقليدية (Hallmann and Rembialkowska, 2008) كذلك معاملة النباتات بالمنظمات

الحيوية Bioregulator IAA NAA التي تزيد من محتو الكاروتينات بصورة عامة وكورفيل b

a (Shotorbani *et al.*, 2013)

Grafting البيتا-كاروتين -carotene 52%

غير المطعمة (Chavez-mendoza *et al.*, 2013).



4-5: الكشف عن بعض جينات *-carotene* في عينات الفلفل الحلو

كشفت عن الجينات *Lcyb* *Crtz* *Ccs* التي لها علاقة في المسار الأيضي للبيتا-كاروتين في

للكشف عن هذه الجينات وبوادي داخلية PCR. الجين

4-5-1: جين *Lcyb*

الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز بتركيز 2% باستعمال البوادي الخارجية وجود الجين في

11 عينة فلفل مدروسة وحجم جزئي قليل 1500 ، بينما أظهر الترحيل الكهربائي

19 عينة فلفل مدروسة 360 زوج قاعدة عندما استعملت البوادي الداخلية.

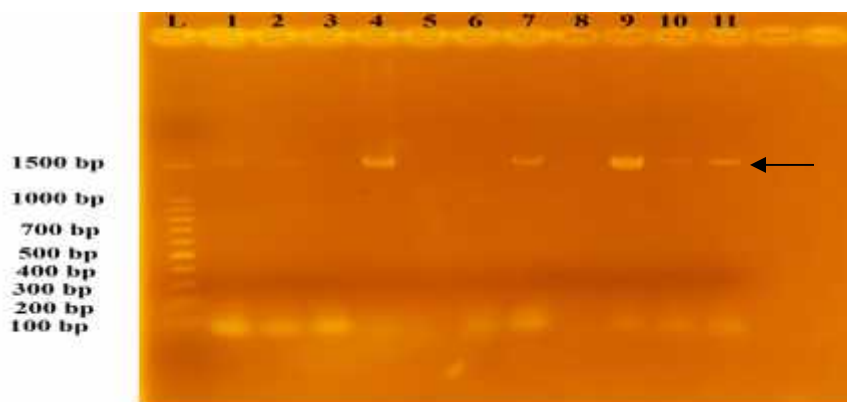
الجين في بعض العينات بالرغم من إنتاجها للبيتا-كاروتين قد لا يعني عدم وجود الجين

مجين العينة، وإنما بسبب عدم توافق البوادي المستعمل في تلك العينة وهذا ما ا لترحيل الكهربائي عند

استعمال البوادي الداخلية، إذ ظهرت قطعة مضخمة بالرغم من عدم ظهورها عند استعمال البوادي الخارجية،

كما في الشكلين (4-18) (4-19). ن وجود الجين *Lcyb* ي Lycopene لى البيتا-

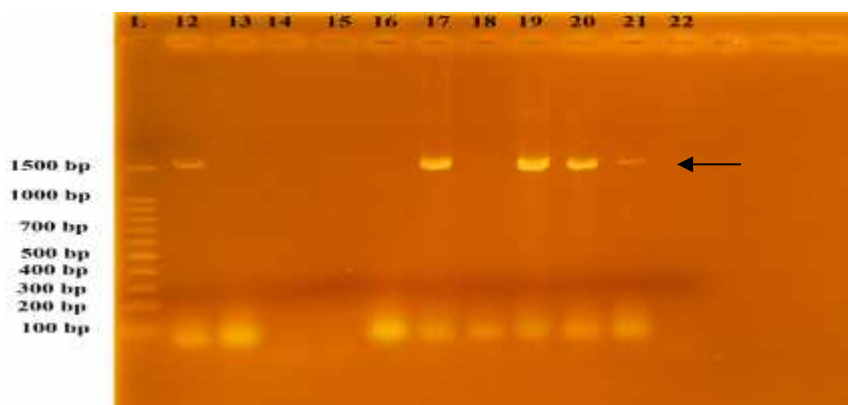
كاروتين *-carotene* .



ك (4-18): الترحيل الكهربي للكشف عن الجين *Lych*

PCR

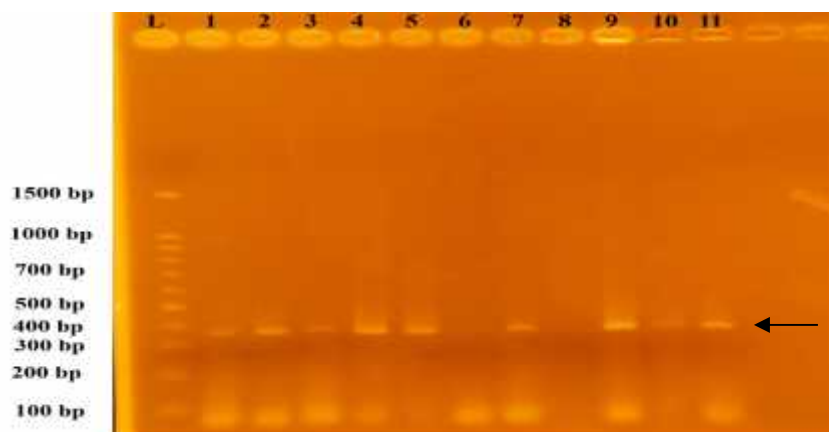
L: الدليل الحجمي (1500)  
 4: فلفل صيني يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
 1 ( ) :1  
 2: / :2  
 3: عراقي/يوسفية :3  
 5: :5  
 6: فلفل صيني :6  
 7: فلفل صيني برتقالي :7  
 8: :8  
 9: :9  
 10: فلفل صيني :10  
 11: فلفل صيني برتقالي :11  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-18): الترحيل الكهربي للكشف عن الجين *Lych*

PCR

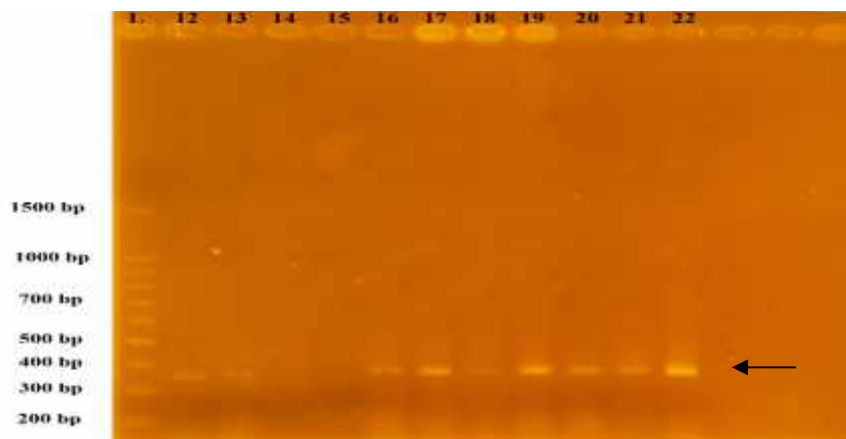
L: الدليل الحجمي (1500)  
 15: يراني بر :15  
 12 ( ) :12  
 16: يراني :16  
 13: يراني :13  
 17: :17  
 14: :14  
 18: :18  
 19: :19  
 20: :20  
 21: :21  
 22: :22  
 . السهم يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



٤٤ (4-19): الترحيل للكشف عن الجين *Lych* PCR

L: الدليل الحجمي (1500)  
 4: فلفل صيني يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
 5: فلفل صيني  
 9: فلفل صيني  
 1: ( فلفل صيني  
 6: فلفل صيني  
 2: فلفل صيني  
 3: فلفل صيني  
 7: فلفل صيني  
 8: فلفل صيني  
 11: فلفل صيني  
 10: فلفل صيني

بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين (رحلت العينات باستعمال هلام)



٤٤ (4-19): الترحيل للكشف عن الجين *Lych* PCR

L: الدليل الحجمي (1500)  
 12: ( فلفل صيني  
 16: فلفل صيني  
 15: فلفل صيني  
 19: فلفل صيني  
 13: فلفل صيني  
 17: فلفل صيني  
 14: فلفل صيني  
 18: فلفل صيني  
 22: فلفل صيني  
 21: فلفل صيني

بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين (رحلت العينات باستعمال هلام)

4-5-2: الكشف عن الجين *Crtz*

الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز بتركيز 2% باستعمال البوادي الخارجية وجود الجين في

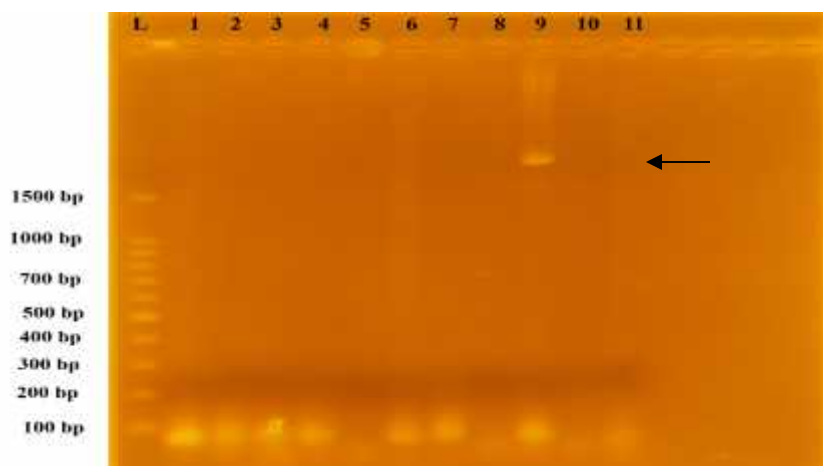
عينة / : = ؛ 1500 زوج قاعدة، بينما اظهر الترحيل  
3 عينه اقي/يوسفية

يراني الأخضر = 760 ندما استعملت البوادي الداخلية. ان عدم ظهور الجين في بعض

العينات يك بسبب عدم توافق البادي المستعمل في تلك العينة ه العينات ليس لها القابلية على

*-cryptoxanthin* والزرانثين *Zeaxanthin*، وكما في الشكلين (4-20) (4-21). ن وجود الجين

*Crtz* يكون مهماً في تحويل *-carotene* الى البيتا-كروتوزانثين *-cryptoxanthin* *Zeaxanthin*.

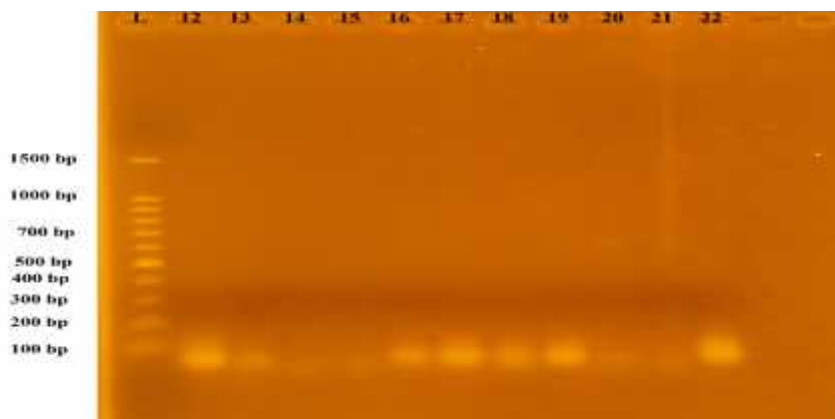


ك (4-20): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Crtz*

PCR

L: الدليل الحجمي (1500)  
4: فلفل صيني يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
5: /  
6: فلفل صيني  
7: فلفل عراقي/يوسفية  
8: /  
9: فلفل صيني  
10: فلفل صيني  
11: فلفل صيني برتقالي.

(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

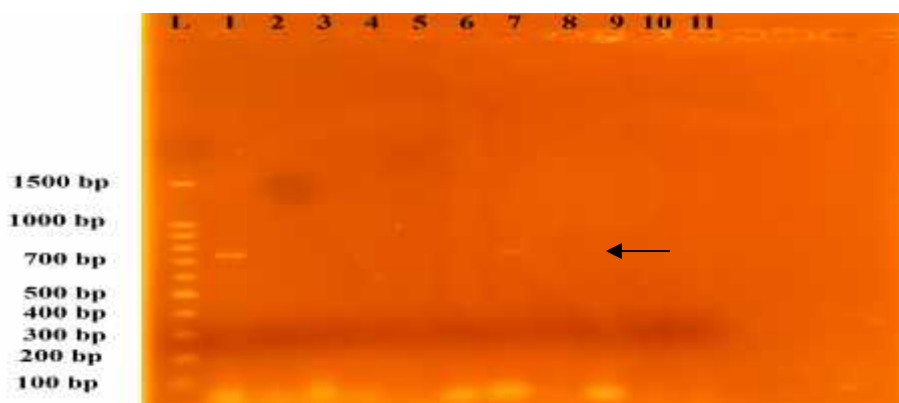


٤ (4-20): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Crtz*

PCR

L: يل الحجمي (1500) يراني بر :15 يراني :14  
 سباني طويل :12 ( :16 يراني :15 يراني :14  
 :18 :17 :19 :20 :21 :22  
 سباني طويل :17 :20 :21 :22  
 يراني :18 :22  
 . السهم يشير الى قطع الدنا المضخمة.

(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



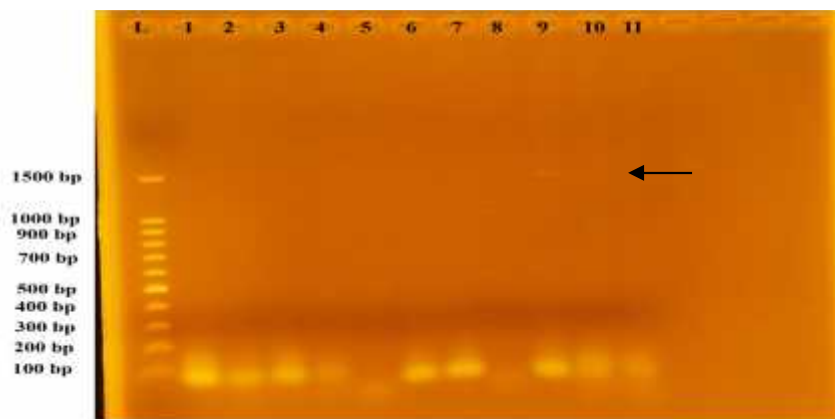
٤ (4-21): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Crtz*

PCR

L: الدليل الحجمي (1500) :1 ( :5 :4  
 :2 :6 :9  
 :3 :7 :10 :11  
 :8 :9  
 فلفل صيني :9  
 فلفل صيني / :6  
 فلفل صيني :10  
 فلفل صيني / يوسفية :7  
 فلفل صيني برتقالي :11  
 فلفل صيني :3  
 فلفل صيني :8  
 يشير الى قطع الدنا المضخمة.

(رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)

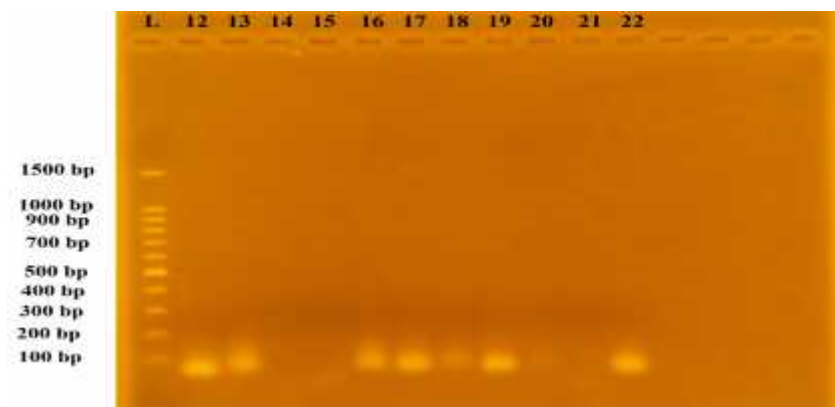




ك (4-22): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Ces*

PCR

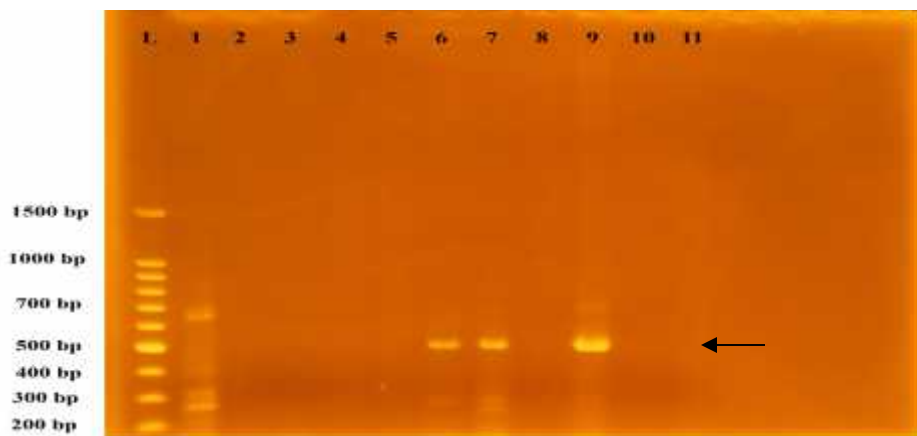
L: الدليل الحجمي (1500)  
 4: فلفل صيني يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
 5: فلفل صيني  
 6: فلفل صيني  
 7: فلفل عراقي/يوسفية  
 8: فلفل صيني برتقالي.  
 9: فلفل صيني  
 10: فلفل صيني  
 11: فلفل صيني برتقالي.  
 1: ( )  
 2: /  
 3: /  
 4: /  
 5: /  
 6: /  
 7: /  
 8: /  
 9: /  
 10: /  
 11: /  
 12: /  
 13: /  
 14: /  
 15: /  
 16: /  
 17: /  
 18: /  
 19: /  
 20: /  
 21: /  
 22: /  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-22): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Ces*

PCR

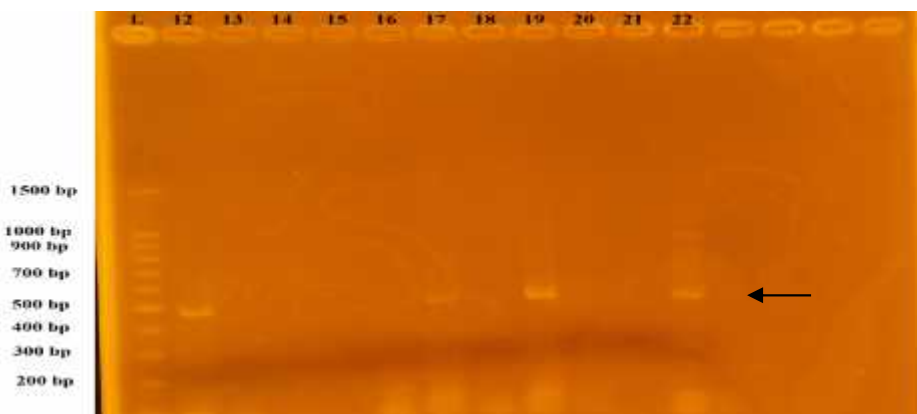
L: الدليل الحجمي (1500)  
 12: ( )  
 13: يراني  
 14: يراني  
 15: يراني  
 16: يراني  
 17: يراني  
 18: يراني  
 19: يراني  
 20: يراني  
 21: يراني  
 22: يراني  
 12: ( )  
 13: يراني  
 14: يراني  
 15: يراني  
 16: يراني  
 17: يراني  
 18: يراني  
 19: يراني  
 20: يراني  
 21: يراني  
 22: يراني  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-23): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Ccs*

PCR

L: الدليل الحجمي (1500)  
 4: فلفل صيني يشير الى قطع الدنا المضخمة.  
 5: فلفل صيني  
 6: فلفل صيني  
 7: فلفل عراقي/يوسفية  
 8: فلفل صيني برتقالي  
 9: فلفل صيني  
 10: فلفل صيني  
 11: فلفل صيني برتقالي  
 1 ( )  
 2: /  
 3: /  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



ك (4-23): الترحيل الكهربائي للكشف عن الجين *Ccs*

PCR

L: الدليل الحجمي (1500)  
 12: فلفل صيني  
 13: فلفل صيني  
 14: فلفل صيني  
 15: فلفل صيني  
 16: فلفل صيني  
 17: فلفل صيني  
 18: فلفل صيني  
 19: فلفل صيني  
 20: فلفل صيني  
 21: فلفل صيني  
 22: فلفل صيني  
 1 ( )  
 2: /  
 3: /  
 (رحلت العينات باستعمال هلام بتركيز 2%، جهد كهربائي 75 فولت ولمدة ساعتين)



عدة جينات مرشحة *Psy GGPS FPS* في مسلك تصنيع الكاروتينات وهي *Psy GGPS FPS* وينت النتائج *Psy* فقط يكون *Co-* *Ccs Lcy PDS* الجيل الثاني F2 (Huh et al., 2001). (Hirschberg et al., 2007) *al., 1997 ; Ha et al., 2007* تعبير لجينات *VDE BcH (CrtZ-2) PDS Psy* *Ccs Lcy-B* يكون *Ccs Lcy-B* عالية من الكاروتينات الكلية في *C. baccatum C.chinense C. pubescence ،Capsicum annum* ثنين من هذه الجينات *في المستويات الواطنة من الكاروتينات* تعبير لجينات الخاصة بالتصنيع الحيوي للكاروتينات هي المفتاح الرئيسي لتنظيم مستوى الكاروتينات الكلية *(Rodriguez-Urbe et al., 2012)* تعبير لجينات *Lcy-B Psy* *Ccs BcH (CrtZ-2)* كاروتينات بمستويات عالية. *Ccs* ن جين *(Popovsky and Paran, 2000 ; Lefebvre et al., 1998)* ن حذف هذا الجين ينتج عنه ثمار *(Lang et al., 2004)* ن فقدان التعبير جين *Ccs* نتيجة حذف *Upstream* *cv. 277 long* *cv. Msgty-1* ذ تبين عدم وجود *Capsanthin* بينما *Ccs* جين حدد لون الثمرة بتغيير ترتيب الكاروتين. بين *(Ha et al., 2007)* *Ccs* جين موجود في صنفين من وهذه النتيجة لم تظهر في الدراسات السابقة وتحليل التسلسلات النيكلوتيدية لهذا الجين *ك* عن طفرتين

Frameshift

ترايبيتين Structural mutations

*Ccs* جين

Premature stopcodon

قترحت نتائج هذه الدراسة وجود طفرات عديمة المعنى تتوسط عملية ستساخ الجين

. ن اللون البرتقالي ناتج عن غياب جين *Ccs* هذا ما بينه

(Popovsky and Paran, 2000 ; Lang *et al.*, 2004) ن ترايب ومستوى تعبير جين *Ccs* يكون

محدد لمستويات الكاروتينات الكلية (Ha *et al.*,

2007) التي بينت (Bouvier *et al.*, 1994) حمر يراكم مستويات عالية من

Capsanthin الناتجة من تعبير الجين *Ccs* (Thorup *et al.*,

2000) بين ن الفلفل هو الجنس الوحيد الذي يعبر جين *Ccs* ن بنك الجينات يحوي على تسلسل

mRNA لهذا الجين بطول 499 ميني Yolo wonder

.6

4-6: الجينات الخاصة بتصنيع البيتا-كاروتين

DNA sequencing بعض الجينات الخاصة بتصنيع البيتا-كاروتين

من عينات الجينات *Ccs Crtz Lcyb*. ختيرت بعض عينات

عند استعمال البوادي الداخلية.

#### 4-6-1: المقارنة بين التسلسل التتاعي لجين *Lcyb* بعض من عينات الفلفل الحلو Refseq لجين

360 قطع الجين *Lcyb*

التسلسل التتاعي القياسي للجين *Lcyb*

NCBI ميربي

Accession number للتسلسل التتاعي القياسي <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

للجين *Lcyb* GU085266 اتحاد الدولي للكيمياء

(2) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

ين بداية ونهاية التسلسل التتاعي التحليل الوراثي تكون غير واضحة

النيوكليوتيد

واضحة والمميزة فقط تجنبا حتى ولو كان في قاعدة نتروجينية واحدة وك

النيكوتيدية طراف يعد غير معنوي. ختيرت

بعض عينات نتائج في حالة تطابق التسلسلات النيكوتيدية لجمع

العينات المدروسة ومقارنتها مع التسلسل النيكوتيدي القياسي Refseq الجين *Lcyb*. بينت

التسلسل التتاعي لقطعة من الجين *Lcyb* بعض من عينات الفلفل الحلو الأخضر ا وجود تشابه كبير

بين التسلسلات التتاعية لقطعة الجين المدروسة التسلسل التتاعي القياسي Refseq لجين

بعض القواعد النايتروجينية بين العينات المدروسة ( 4-24).

في قطع الجين *Lcyb* بعض عينات الفلفل الأصفر ( 4-25)

( 4-26 ) نتائج التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Lcyb* في بعض عينات الفلفل الأحمر قد

810 كان هجيناً مع احتمالية وجود القاعدة النايروجينية الثايمين T و الكوانين G

جميع عينات الفلفل الحلو الأحمر بالمقارنة مع التسلسل التتابعي قياسي التي وجدت القاعدة النايروجينية الكوانين G. 812، إذ كان هجيناً مع احتمالية وجود الأدينين A و الكوانين G

في جميع عينات الفلفل الحلو الأحمر بالمقارنة مع التسلسل التتابعي القياسي التي وجدت القاعدة النايروجينية الكوانين G، بينم *K* التسلسلات التتابعية متطابقة مع التسلسل التتابعي القياسي Refseq ( *K* ) (4-27).

نظر لعدم وجود تغيرات كثيرة بين التسلسلات التتابعية في قطع الجين *Lcyb*

التتابعي القياسي Refseq لذا فقد استخرجت قيم التشابه بين التسلسلات التتابعية لتلك القطع في عينات الفلفل الحلو المدروسة. وجدت اعلى قيمة تشابه بين عينة الفلفل العراقي/الصويرة الأخضر وبين عينة الفلفل يراني الأخضر وقيمة 0.903، بينما اقل قيمة تشابه فقد وجدت بين عينة الفلفل الأردني الأصفر وعينة الفلفل الصيني الأصفر وقيمة 0.539. ذه النتائج توضح امكانية استعمال بعض الجينات كمؤشرات التباير الوراثي ومنها الجينات الخاصة ببناء البيتا-كاروتين لاسيما جين *Lcyb* ( 4-8).

Alignment: Green-Lcyb

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	660	670	680	690	700
Refseq-Lcyb	AACTGGCTTC	TCTAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG
LCYb-4	TACAGSCTTC	TCTAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG
LCYb-9	ACTGMGCTTC	TCTAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG
LCYb-12	RGCACGGCCT	TGGGAATCTC	TKGTW--AGA	TRATAAGCCT	TATAMCCCGG
LCYb-19	AAAGGGACTT	GGGAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAMCCCGG
LCYb-22	TCCTTCCCGC	TGTTKGTTCYC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	710	720	730	740	750
Refseq-Lcyb	GGTATCAAGT	AGCTTATGGC	ATTTTGGCTG	AAGTTGAAGA	GCACCCCTTT
LCYb-4	GGWATCAAGT	AGCTTATGGC	WTTTTGGCTG	AAGTTTRAARA	GCACCCCTTT
LCYb-9	GGTATCAAGT	AGCTTATGGC	ATTTTGGCTG	AAGTTGAARA	GCMCCCTTT
LCYb-12	GGTATCARGW	ASCTTATGGC	WTTTTGGCTG	AAGTTTRAAA	SCCCCTTT
LCYb-19	GGWATCAAGT	ASCTTATGGC	WTTTKGGCTG	AAGTTTRAARA	GCACCCCTTT
LCYb-22	GGTATCAAGT	AGCTTATGGC	ATTTTGGCTG	AAGTTGAARA	GCACCCCTTT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	760	770	780	790	800
Refseq-Lcyb	GATGTAAACA	AGATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAAGAA
LCYb-4	GATGTAAACA	ARATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAARAA
LCYb-9	GATGTAAACA	AGATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAARAA
LCYb-12	GATGTAAACA	ARATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	TTTTGAAGAA
LCYb-19	GATGTAAACA	ARATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAARAA
LCYb-22	GATGTAAACA	ARATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAARAA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	810	820	830	840	850
Refseq-Lcyb	CAACGTTGAG	CTCAAGGAGA	GAAATAGTAG	AATACCAACT	TTCCTTTATG
LCYb-4	CAACGKGRAG	CTCARGGARA	GAAATAGWAR	AATACCAACT	TTCYTTTWTG
LCYb-9	CAACGTTGAG	CTCAAGGAGA	GAAATAGTAR	AATACCAACT	TTCCTTTATG
LCYb-12	CAACGTTGAG	CTCARGGAAA	AAAATARAAA	AATACCAATT	TTCCTTTATG
LCYb-19	CAACGKGGAG	CTCARGGARA	GAAATAGWAR	AATACCAACT	TTCCTTTATG
LCYb-22	CAACGGGGAG	YTCAAGGAGA	GAAATAGTAR	AATACCAACT	TTCCTTTATG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	860	870	880	890	900
Refseq-Lcyb	CCATGCCATT	TTCATCCAAC	AGGATATTTT	TTGAAGAAAAC	CTCACTTGTT
LCYb-4	CCWTGCCWTT	TTCWTCCAAC	AGGATWTTTY	TTGAARAAAAC	CTCMYTTGTT
LCYb-9	CCWTGCCWTT	TTCWTCCAAC	AGGATATTTT	TTGAARAAAAC	CTCACTTGTT
LCYb-12	CCWTCCCTTT	TAAATCAAAA	AGGAAATTTA	TAAAAAAAAC	CTAAATTTGTT
LCYb-19	CCWTGCCWTT	TTCATCCAAC	AGGATATTTT	TTGAARAAAAC	CTCMCTTGTT
LCYb-22	CCATGCCATT	TTCWTCCAAC	AGGWTATTTT	TTGAARAAAAC	CTCACTTGTT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	910	920	930	940	950
Refseq-Lcyb	GCTCGTCCTG	GTTTGGGTAT	GGATGATATT	CAAGAACGAA	TGGTGGCTCG
LCYb-4	GYTCGTCCCKG	GTTKGGGTAT	GGATGATATT	CAARAACRAA	KGGKGGYTCK
LCYb-9	GCTCGTCCTG	GTTTGGGTAT	GGATGATATT	CAARAACGAA	TGGKGGCTCK
LCYb-12	GCCCGCCCGG	GTTGGGTATG	GGATGATATC	CAAAAAGGAG	GGGGGGCTGG
LCYb-19	GCTCGYCCCKG	GTTKGGGTAT	GGATGATATT	CAARAACRAA	TGGKGGCTCK
LCYb-22	GCTCGTCCTG	GTTTGGGTAT	GGATGATATT	CAAGAACGAA	KGGKGGCTCG

ك (4-24): Alignment القواعد النروجينية قطعة من الجين *Lcyb* في عينات يكلوتيدي القياسي\*

\* عينات التي درس فيها التسلسل التتابعي هي 4: 9: فلفل عراقي/صويرة 12: 19: 22: يراني

A = الأدينين، T = الثايمين، G = الكوانين، C = السايوسين. = العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير



Alignment: Orange-Lcyb

	..... ..... ..... ..... ..... .....	610	620	630	640	650
Refseq-Lcyb	TTGATATGCA	ATGATGGTAT	TACTATTCAG	GCGACAGTGG	TGCTCGATGC	
Lcyb-11	-----SCTTC	GCKAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG	
Lcyb-17	-----	-----	-----CCTG	GCCCCGGGAA	TG--ARRTGC	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	660	670	680	690	700
Refseq-Lcyb	AACTGGCTTC	TCTAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG	
Lcyb-11	-----SCTTC	GCKAGATCTC	TTGTTTCAGTA	TGATAAGCCT	TATAACCCCG	
Lcyb-17	----GGGTGC	TTKGGGACY-	TTGTYCAGWA	TGATAASCCT	TATAACCCCG	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	710	720	730	740	750
Refseq-Lcyb	GGTATCAAGT	AGCTTATGGC	ATTTTGGCTG	AAGTTGAAGA	GCACCCCTTT	
Lcyb-11	GGWATCAAGW	AGCA-AGGGA	ATTTKGGCTG	AAGTTGAARA	GCACCCCTTT	
Lcyb-17	GGTATCARGT	ASCTTATGGC	ATTTTGGCTG	AAGTTGAARA	GCACCCCTTT	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	760	770	780	790	800
Refseq-Lcyb	GATGTAAACA	AGATGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAAGAA	
Lcyb-11	GAKGTAAACA	AAAAGGTTTT	CATGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAAGAA	
Lcyb-17	GATGWAAACA	AGATGGTTTT	CWTGGATTGG	CGCGACTCTC	ATTTGAAGAA	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	810	820	830	840	850
Refseq-Lcyb	CAACGTTGAG	CTCAAGGAGA	GAAATAGTAG	AATACCAACT	TTCCTTTATG	
Lcyb-11	CAACGKGGAG	CTCARGGAGA	GAAATAGTAG	AATACCAMCT	TTCCTTTATG	
Lcyb-17	CAACGKGRAG	CTCAAGGAGA	GAAATAGTAG	AATACCAACT	TTCCTTTATG	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	860	870	880	890	900
Refseq-Lcyb	CCATGCCATT	TTCATCCAAC	AGGATATTTT	TTGAAGAAAC	CTCACTTGTT	
Lcyb-11	CCATGCCWTT	TTCATCCAAC	AGGATATTTT	TTGAARAAC	CTCMCTTGTT	
Lcyb-17	CCATGCCWTT	TTCATCCAAC	AGGATATTTT	TTGAARAAMC	CTCACTTGTT	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	910	920	930	940	950
Refseq-Lcyb	GCTCGTCCTG	GTTTGGGTAT	GGATGATATT	CAAGAACGAA	TGGTGGCTCG	
Lcyb-11	GCTCGTCCTG	GTTTGGGT-T	GGATGAA--T	TAAAACGAA	TGGKGGCTCK	
Lcyb-17	GCTCGYCKG	GTTTGGGTAT	GGATGATATT	CAARAACRAA	TGGKGGCTCG	
	..... ..... ..... ..... ..... .....	960	970	980	990	1000
Refseq-Lcyb	TTTAAGTCAC	TTGGGGATAA	AAGTTAAGAG	CATTGAAGAG	GATGAACATT	
Lcyb-11	TTWAAGTACC	TTGGAA	-----	-----	-----	
Lcyb-17	TTWAAKUMMY	TGGGA	-----	-----	-----	

ك (4-26): Alignment القواعد النروجينية في قطعة من الجين *Lcyb* في عينات الفلفل

الحلو البرتقالي والتسلسل النيكلوتيدي القياسي\*

\* عينات الفلفل التي درس فيها التسلسل التتابعي هي 11: فلفل صيني برتقالي 17:

A = الأدينين، T = الثايمين، G = الكوانين، C = السايروسين. = مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير ا





تسلسلات جين *Ccs* مع جين *Lcyb* 55% 72%  
 ين كلا الجينين ينحدران من اصل مشترك (Huguency *et al.*, 1995).  
 (Cuzman *et al.*, 2010) ين عن تسلسلات cDNA لجين  
 المحفوظة في بنك الجين Yolo wonder هذا الجين  
 -carotene  
 يجد ين عند رصف تسلسلاته مع تسلسلات الجين الم  
 الجينات وظهر تعدد شكلي للجين ناتج عن تغير في الأ  
 مينية ذ تغير الحامض الأميني  
 Alanine 146 وهو حامض اميني كاره للماء الى الحامض الأميني Threonine  
 152 ذ تغير الأميني Lysine الحامض الأميني  
 Asparagine كذلك تغير الحامض الأميني لموقعي 436 456  
 من جين *Lcyb* البرتقالية التي درسها كوزمان وجماعته. وقد وجدت نسخ هذا  
 الجين ايضاً (Rodriguez-Urbie *et al.*, 2012)  
 في الثمار الناضجة وغير الناضجة.

#### 2-6-4: المقارنة بين التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Crtz*

#### Refseq لجين في بعض من عينات الفلفل الحلو

ابعي لقطع الجين *Crtz* والتي كان حجمها الجزئي 760  
 التسلسل التتابعي القياسي للجين *Crtz* ي لمعلومات التقانة الأحيائية

ميرفي NCBI :  
 Accession number :  
 . بينت النتائج وجود نوعين  
 Crtz لقياسي للجين  
 من التغيرات الجينية هي  
 Substitution في قطعة الجين Crtz  
 Deletion  
 لقاعدة النايتروجينية الكوانين G لقاعدة النايتروجينية الثايمين T  
 في الموقعين 846 850  
 852 860 861 كذلك كان هناك  
 لقاعدة النايتروجينية السايتوسين C  
 A النايتروجينية الأدينين  
 بين 856 862  
 لقاعدة النايتروجينية السايتوسين C  
 T في الموقعين 864 870 .  
 النايتروجينية ATA من قطعة الجين Crtz في عينة الفلفل الأردني البرتقالي بالمقارنة مع التسلسل التتابعي  
 Refseq بينما كانت  
 متتابقة مع التسلسل التتابعي القياسي Refseq  
 (4-28). لم تجر عليها تحليلات التشابه بين التسلسلات التتابعية لكون النتائج كانت تشمل  
 عينة واحدة. جين Crtz-2 جين CHY2 : -caroten hydroxylase  
 Hydroxylates حلقات بيتا الموجودة على البيتا-كاروتين -carotene  
 . بحسب تسلسل الجين وجد ان منطقة التشفير Coding region  
 cDNA  
 الجينات وهي نفسها في ثم  
 (Cuzman et al., 2010). سخ هذا الجين كان متشابهاً في الأ  
 (Rodriguez-Urbie et al., 2012) مع اختلافات بسيطة جداً بين الثمار الناضجة  
 وغير . (Borovsky et al., 2013) EMS-inducedmutant  
 الجين مما يؤدي الى انتاج وتراكم للكاروتينات البرتقالية -carotene الكاروتينات  
 Maor هذه الطفرة حولت القاعدة الأدينين الكوانين،  
 لباحثون ان جين Crtz-2

## Results and Discussion

: ٤

(4-8): قيم التشابه بين التسلسلات التتابعية لقطعة من الجين *Lcyb* في عينات الفلفل الحلو المدروسة

العينات	2	3	4	9	10	11	12	16	17	18	19	20	22
2	1	0.596	0.880	0.853	0.677	0.832	0.739	0.796	0.803	0.814	0.868	0.844	0.835
3		1	0.569	0.599	0.539	0.589	0.575	0.592	0.592	0.582	0.598	0.598	0.590
4			1	0.891	0.668	0.808	0.723	0.789	0.812	0.801	0.876	0.837	0.858
9				1	0.695	0.844	0.738	0.816	0.851	0.804	0.864	0.852	0.903
10					1	0.707	0.653	0.692	0.700	0.669	0.676	0.691	0.693
11						1	0.694	0.763	0.785	0.769	0.832	0.793	0.811
12							1	0.747	0.737	0.737	0.755	0.749	0.736
16								1	0.815	0.801	0.836	0.837	0.795
17									1	0.828	0.841	0.841	0.832
18										1	0.813	0.810	0.813
19											1	0.873	0.836
20												1	0.827
22													1

\*2: :3 يطالي :4 :9 فلفل عراقي/صويرة ا :10 :يني ا :11 فلفل صيني برتقالي، :12 :سباني طويل  
:16 :يطالي :17 :يطالي برتقالي، :18 :يطالي :19 :يطالي :20 :يني ا :22 :يراني .

على قيمة تشابه	
قل قيمة تشابه	

Alignment: Jordan/Orange-Crtz1

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
      810      820      830      840      850
Refseq-Crtz TTTTCTGAAA TGTTTTGTAC ATTTCGCTCTC GCCTTTGGCG CTGCCGTAAG
CRTZ-1      -----|-----|-----|-----|-----|
      .....| .....| .....| .....| .....|
      860      870      880      890      900
Refseq-Crtz TTCCACTTTT TCACATATTC AATACTTCTT TACATTTTAT TGA CTGAACA
CRTZ-1      TCGCAAATTC CAAT---TTE CATGGTTCTY T-CATTTTAT TGA CTGAAC-
      .....| .....| .....| .....| .....|
      910      920      930      940      950
Refseq-Crtz CTAAATTAAA TCGATTGCTA ACATTAAATA TTGTAATACT TCAGATAGGA
CRTZ-1      CTAAATTAAA TCGATTGCTA ACATTATATA TGGTAATACT TCASATAGGA
      .....| .....| .....| .....| .....|
      960      970      980      990     1000
Refseq-Crtz ATGGAGTACT GGGCGAGATG GCGCATAGA GCACTATGGC ATGCTTCTTT
CRTZ-1      ATGGAGTACT GGGCGAGATG GYG CATAGA GYACTATGGC ATGCTTCTTT
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1010     1020     1030     1040     1050
Refseq-Crtz GTGGCATATG CACGAGGTTA ATTTGCAAAT CTACACTACA TTATTAAACA
CRTZ-1      GTGGCATATG CACGAGGTTA ATTTGCAAAT CTACRCTACA TTATTAAACA
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1060     1070     1080     1090     1100
Refseq-Crtz ATTAATAAAT AAAGATTCTT GTC AAGTTAT TTCCCATCAA CCAAATATT
CRTZ-1      ATTAATAAAT AAAGATTCTT GTC AAGTTAT TTCCCATCAA CCAAATATT
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1110     1120     1130     1140     1150
Refseq-Crtz GACTCTTGTG ATTTGTCAA AAATATTTGC AGTCACACCA TAGACCAAGA
CRTZ-1      GACTCTTGTG ATTTGTCAA AAATATTTGC AGTCACACCA TAGACCAAGA
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1160     1170     1180     1190     1200
Refseq-Crtz GAAGGACCTT TCGAGCTGAA CGATATTTTT GCCATAATCA ATGCTGTTCC
CRTZ-1      GAAGGACCTT TCGAGCTGAA CGATATTTTT GCCATAATCA ATGCTGTTCC
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1210     1220     1230     1240     1250
Refseq-Crtz AGCTATAGCT CTTCTTTCAT TCGGTTTCAA CCATAAAGGC CTCATCCCTG
CRTZ-1      AGCTATAGCT CTTCTTTCAT TCGGTTTCAA CCATAAAGGC CTCATCCCTG
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1260     1270     1280     1290     1300
Refseq-Crtz GACTATGTTT CGGCGCTGTA CGTGTCTCA TTAACTACC CTTTTTATTA
CRTZ-1      GACTATGTTT CGGCGCTGTA CGTGTCTCA TTAACTACC CTTTTTATTA
      .....| .....| .....| .....| .....|
      1310     1320     1330     1340     1350
Refseq-Crtz TTACGACAAG TAAACTGGA GGAAGAATTT ATTAATTAAT TATCGATTAG
CRTZ-1      TTACGACAAG TAAACTGGA GGAAGAATTT ATTAATTAAT TATCGATTAG

```

ك (4-28): Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين *Crtz* في عيد والتسلسل النيكلوتيدي القياسي\*

\*A = الأدينين، T = الثايمين، G = الكوانين، C = السايتوسين. = مصدر التسلسل التتاعي لدينا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير

### 3-6-4: المقارنة بين التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Ccs* Refseq لجين في بعض من عينات الفلفل الحلو

قورنت نتائج التسلسل التتابعي لقطع الجين *Ccs* 490

التسلسل التتابعي القياسي للجين *Ccs*

ميراثي NCBI رنيت. Accession number

القياسي للجين *Ccs* GU122934. ختيرت بعض عين

في حالة تطابق التسلسلات النيكلوتيدية لجميع العينات المدروسة ومقارنتها مع التسلسل النيكلوتيدي القياسي

Refseq الجين *Ccs*. بينت نتائج التسلسل التتابعي لقطعة من الجين *Ccs* في عينات الفلفل

لى وجود تشابه كبير بين التسلسلات التتابعية لقطعة الجين المدروسة والتسلسل التتابعي

Refseq لجين ختلافات لبعض القواعد النايتروجينية بين العينات

( 4-29). في قطع الجين *Ccs* في عينه الفلفل

يطالي البرتقالي (شكل 4-30). ATT

590-588 CCC

لقاعدة النايتروجينية 596-592 CCCCA GATGC

الكوانين G بالقاعدة النايتروجينية الأدينين A 600 ستبدال القاعدة النايتروجينية السايوسين C

بالقاعدة النايتروجينية الثايمين A 1030 (4-30).

Alignment: Green-Ccs

	560	570	580	590	600
Refseq-Ccs	TTTATAAAGC	CAAGGTTTTG	AAAGTGAAGC	ATGAAGAATT	TGAGTCTTCG
CCS-6	-----	-----	-----	-----	-----
CCS-7	-----	-----	-----	-----	-CCCTCGCAA
CCS-9	-----	-----	-----	-----GGCG	TGGAYCYTCK
CCS-12	-----	-----	-----	-----CC	CGGGTTGCCR
CCS-19	-----	-----	-----	-----CCC	TCCCTCCTCG
CCS-22	-----	-----	-----	-----GC	GCCGCCGCCR

	610	620	630	640	650
Refseq-Ccs	ATTG-TTTGT	GATGATGGTA	GGAAGATAAG	CGGTAGCTTG	ATTGTTGATG
CCS-6	-----	-----	-----	-----	-----
CCS-7	ATAATCTCST	ACTCCTGG-A	TGTCGT--AA	CGGGGACGAG	ACTTCCGAKC
CCS-9	ATTGMMTTYGT	GATGATGGTA	GGAAGATAAG	CGGTARCTTG	ATTGTTGATG
CCS-12	ATTG-TTYGT	GATCATGRTA	YGACGAT-AA	CGGTAAGTAG	ACTGCTGATG
CCS-19	ATTG-TTTGT	GATSMTGGTA	GGAMGATAAA	MGGTARCTWG	ATTGTTGATG
CCS-22	ATTG-TTAGT	G-TG-TGGTT	KGAGAA--AA	CGGT-TCTTG	ATTGWTGATG

	660	670	680	690	700
Refseq-Ccs	CAAGTGGCTA	TGCTAGTGAT	TTTATAGAGT	ATGACAAGCC	AAGAAACCAT
CCS-6	-----	-----	-----	-----	-----
CCS-7	S--GTGGCTA	TGCTASTGAT	TTTATWGTGT	ATGACRGGCT	TA-AAACCAT
CCS-9	CAAGTGGCTA	TGCTAGGGAA	AGKATAGAGT	ATGACAAGCC	AAGAAACCAT
CCS-12	CWAGTGGCTA	TGCTAGTGAT	TTTATAGAGW	ATGACAAGCC	AAGAAACCAT
CCS-19	CAAGTGGCTA	TGCTAGRGAA	ATTATAGAGW	ATGACAAGCC	AAGAAACCAT
CCS-22	CTAGTGGCTA	TGCTAATGAT	TTTGTARAGA	ATGACAAGCC	AAGAAACCAT

	710	720	730	740	750
Refseq-Ccs	GGTTATCAAG	TTGCTCATGG	GATTTTAGCA	GAAGTTGATA	ATCATCCATT
CCS-6	-----	-----	-----GW	AWAWTTCAMT	MCCAT---TT
CCS-7	GGTTATCAAG	TTGCTCATGG	GATTTTGSCA	TAAGKAGATA	ATCRTCCATT
CCS-9	GGTTATCAAG	GGCAASGKGA	RATTTTAGCW	GAAGTTGATA	ATCATCCATT
CCS-12	GGTTATCAAG	TTGCTCATGG	GATTTTAGCA	GAAGTTGATA	ATCATCCATT
CCS-19	GGTTATCAAG	TTGCTCATGG	GATTTTAGCA	GAAGTTGATA	ATCATCCATT
CCS-22	GGTTATCAMG	TTGCTCATGG	GATTTTAGCA	GAAGTTGATA	ATCATCCATT

	760	770	780	790	800
Refseq-Ccs	TGATTT-GGA	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT
CCS-6	CGATTTAGGA	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT
CCS-7	TGATTT-GTA	TAAAATGATG	CTTATGGACT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT
CCS-9	TGATTT-GGA	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	CTCTTWARGW
CCS-12	TGATTT-GGA	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT
CCS-19	TGATTT-GGA	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT
CCS-22	TGATTT-GRG	TAAAATGATG	CTTATGGATT	GGAGGGATTC	TCATTTAGGT

ك (4-29): Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين *Ccs* في عينات الفلفل الحلو الأخضر والتسلسل النيكلوتيدي القياسي\*

\* = عينات ال التي درس فيها التسلسل التتاعي 6: / 7: فلفل عراقي/يوسفية ا 9: فلفل عراقي/صويرة 12: 19: 22: يراني

A = الأدينين، T = الثايمين، G = الكوانين، C = السايتوسين. = مصدر التسلسل التتاعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير

Alignment: Italy-Orange-Ccs

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                    560      570      580      590      600
Refseq-Ccs      TTTATAAAGC CAAGGTTTTG AAAGTGAAGC ATGAAGAATT TGAGTCTTTCG
CCS-17          -----
                    610      620      630      640      650
Refseq-Ccs      ATTGTTTGTG ATGATGGTAG GAAGATAAGC GGTAGCTTGA TTGTTGATGC
CCS-17          ATTGTTTGTG ATSATGGTAG GYAGATAAAM GGTAKCTTGA TTGYTGATGC
                    660      670      680      690      700
Refseq-Ccs      AAGTGGCTAT GCTAGTGATT TTATAGAGTA TGACAAGCCA AGAAACCATG
CCS-17          AAGTGGCTAT GCTAGTGAAT T-ATARAGWA TGACAAGCCA AGAAACCATG
                    710      720      730      740      750
Refseq-Ccs      GTTATCAAGT TGCTCATGGG ATTTTAGCAG AAGTTGATAA TCATCCATTT
CCS-17          GTTATCAAGT TGCTCATGGG ATTTTAGCAG AAGTTGATAA TCATCCATTT
                    760      770      780      790      800
Refseq-Ccs      GATTTGGATA AAATGATGCT TATGGATTGG AGGGATTCTC ATTTAGGTAA
CCS-17          GATTTGKATA AAATGATGCT TATGGATTGS AGGGATTCTC ATTTAGGTAA
                    810      820      830      840      850
Refseq-Ccs      TGAGCCATAT CTGAGGGTGA AGAATACTAA AGAACCAACA TTCTTGTATG
CCS-17          TGAGCCATAT CTGAGGGTGA AGAATACTAA AGAACCAACA TTCTTGTATG
                    860      870      880      890      900
Refseq-Ccs      CAATGCCATT TGATAGGAAT TTGGTATTCT TGGAAGAGAC TTCTTTAGTG
CCS-17          CAATGCCATT TGATAGGAAT TTGGTATTCT TGGAAGAGAC TTCTTTAGTG
                    910      920      930      940      950
Refseq-Ccs      AGTCGGCCTA TGTTATCGTA TATGGAAGTG AAAAGAAGGA TGGTAGCAAG
CCS-17          AGTCGGCCTA TGTTATCGTA TATGGAAGTG AAAAGAAGGA TGGTAGCAAG
                    960      970      980      990      1000
Refseq-Ccs      ATTAAGACAT TTGGGGATCA AAGTGAGAAG TGTCCTTGAG GAAGAGAAGT
CCS-17          ATTAAGACAT TTGGGGATCA AAGTGAGAAG TGTCCTTGAG GAAGAGAAGT
                    1010     1020     1030     1040     1050
Refseq-Ccs      GTGTGATCAC TATGGGAGGA CCACTTCCGC GGATTCCTCA AAATGTTATG
CCS-17          GTGTGATCAC TATGGGAGGA CCACTTCCGA -----

```

ك (4-30): Alignment القواعد النتروجينية في قطعة من الجين *Ccs* في عينة الفلفل الإيطالي البرتقالي والتسلسل النيكلوتيدي القياسي\*

\*A = الأدينين، T = الثايمين، G = الكوانين، C = السايتوسين. = مصدر التسلسل التتاعي للدنا من بنك الجينات الذي قو مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير الى وجود ا .

نظر لعدم وجود تغيرات كثيرة بين التسلسلات التتابعية في قطع الجين *Ccs*

التتابعية القياسي Refseq لذا فقد استخرجت قيم التشابه بين التسلسلات التتابعية لتلك القطع في عيّن

على قيمة تشابه بين عينة الفلفل / وبين عينة الفلفل

الأخضر وقيمة 0.966، بينما اقل قيمة تشابه فقد وجدت بين عينة الفلفل /

وعينة الفلفل / 0.611. ن هذه النتائج توضح ا ك عمال بعض الجينات

التغاير الوراثي ومنها الجينات الخاصة ببناء البيتا-كاروتين و جين *Ccs* ( 4-

(9).

(9-4): قيم التشابه بين التسلسلات التتابعية لقطعة من الجين *Ccs* في عينات الفلفل الحلو

\*

العينات	6	7	9	12	17	19	22
6	1	0.646	0.611	0.649	0.643	0.646	0.652
7		1	0.783	0.882	0.860	0.863	0.862
9			1	0.869	0.874	85 0.8	0.847
12				1	0.939	0.944	0.932
17					1	0.966	0.926
19						1	0.921
22							1

\*6 = / 7: فلفل عراقي/يوسفية اخضر، 9: فلفل عراقي/صويرة ا 12: سباني طويل  
17: يطالي برتقالي، 19: يطالي 22: يراني .

على قيمة تشابه	
قل قيمة تشابه	



*Ccs* وجدوا حذفاً في جين *Ccs* (Lefebvre *et al.*, 1998)

منطقة التشفير 3' 220 (Popovsky and Paran, 2000)

Coding region مما يشير الى ان هذا الجين يحدد اللون الأ . ان دراسة تسلسل جين

*Ccs* يبين وجود تطابق مع تسلسل هذا الجين في بنك الجينات Down stream

ية فروقات بين ا Up stream

اللون وهذا يشير الى ان هذا الجين مرشح تحديد اللونين الأ (Lang *et al.*,

(Kang *et al.*, 2001) (Thorup *et al.*, 2000) .2004)

(Lang *et al.*, 2004) في ان جين *Ccs* هو المسيطر على اللونين الأحمر والبرتقالي وذلك بتغيير ترتيب

الكاروتينات مما يوضح ان اللون البرتقالي هو ناتج عن نقص في تعبير جين *Ccs* نتيجة حذف منطقة Up

stream . Multiple alignment لتسلسل النيوكليوتيدات لمحت جين *Ccs* في

تغاير بسيط عند

11 (Bouvier *et al.*, 1998)

176 88

*C. chinense* ي لمحت جين *Ccs*

*C. baccatum* الذي يشير الى قرابة قوية بين هذين الجنسين ومن هذه المعلومات

الجين يعكس تنوعاً

(PI164918)Y3 (PI800065)Y2 لم يوجد اي تراكم لمادة Capsanthin

لمناطق تشفير ومحت لجين *Ccs* في مجنهما ومن الجدير بالملاحظة ان هذا الجين لم يظهر مسبقاً في

ف تسلسلات منطقة التشفير وجدت طفرتان ترتيبيتان واحدة سببت طفرة ازاحة  
 1431 Frame shift مما أدى الى انهاء مبكر للترجمة وذلك بحشر 8

Premature stop Y3 Y2

codon تغيير قاعدة واحدة في 599. Y2 سببت قطع بروتين

Ccs 495 حامضاً امينياً و Y3 119 حامضاً امينياً (Ha et al., 2007).

ان منطقة التشفير جين Ccs 1.5 كيلو زوج قاعدة

Golden (Bouvier et al., 1994) الذي اورد عدم وجود جين Ccs صنفين

Jaunedé pignerolle summer (Guzman et al., 2010)

Fogo يؤدي الى الكاينثين Capsanthin الكابسورين

Capsorubin جين Ccs-3 نتيجة حذف القاعدة النايتروجينية

Coding Frame shift 1283 Cytosine

sequence تطاقت فيها التسلسلات لجين Ccs

نك الجينات لهذا الجين وهي تسلسلات مأخوذة من الفلفل الاحمر Yolowonder.

Canary الثمار البرتقالية المصفرة فلم يلاحظ فيها اي وجود للكاروتينات الحمراء بالرغم من وجود جين

Ccs يرجع Translation control

تعبير هذا الجين في هذا الصنف (Kim et al., 2010)

التسلسلات النيكلوتيدية Up stream جين Ccs

غير الناضجة والناضجة	نسخ جين <i>Ccs</i>
Orange grande Oriole	ذ لم تلاحظ نسخ هذا الجين في كلا
لفلفل يتضمن عمليات معقدة أكثر من وجود حذف في احد الجينات	
الترميبية المسؤولة عن تصنيع الكاروتينات (Rodriguez-Urbe <i>et al.</i> , 2012). (Li <i>et al.</i> ,	
<i>Ccs</i> من جين جديد من جين	156 (2013)
<i>C. annuum</i>	Ck7
Coding	Premature stop codon
1095	sequence لجين <i>Ccs</i> نتيجة تحول السايتوسين الى الكوانين
Down stream	Down stream
	تعبير جين <i>Ccs</i> يؤثر
Tandem repeat sequence	176
والباحثون قاموا بإعادة	
الباحثين (Ha <i>et al.</i> , 2007) التي حددوا فيها ثلاثة اصناف من تسلسلات المحث	
Species-specific variation	اختلافات لهذه المنطقة تعكس اختلافاً
<i>C. baccatum</i>	R26 R38 وكانت نتيجة الا
سلبية وهذا يمكن ان يحدث نتيجة	
(Tian <i>et</i>	اختلاف اصناف الفلفل المدروسة في كلا الدراستين وال
Ck7	النكلوتيدية فقد الى جينات <i>Ccs</i> تحليل (al., 2015)
مينية المسؤول عنها هذا الجين	بنسبة 97.36%
	R37-1

تعبير	Ck7	Ck7 R37-1 R15	جين Ccs
R37-1		ان لون ثماره ا صفر لم يظهر تعبير هذا الجين	

## Conclusions الاستنتاجات

1. هناك بعض التباين في نتائج شجرة القرية لعينات الفلفل الحلو المدروسة باستخدام تقانات مختلفة ويمكن الاعتماد على تقانة SSR-PCR بشكل اوسع، نظراً للكلفة العالية عند استعمال تقانة AFLP-PCR وعدم دقة تقانة RAPD-PCR بالرغم من استعمالها العديدة في الكثير من المختبرات لكلفتها القليلة ولاعتمادها على بواقي عشوائية تتكون من عشرة قواعد نايتروجينية بالمقارنة مع البواقي المستعملة في التقانات الأخرى.
2. يمكن استعمال الجينات المسؤولة عن البناء الحيوي للبيتا-كاروتين كمؤشرات أيولوجية على التباين الوراثي في الفلفل الحلو مثل جينات *Lcyb*، *Crtz*، *Ccs*.
3. بينت دراسات التسلسل التتابعي للجين *Lcyb* الذي له علاقة بالبناء الحيوي للبيتا-كاروتين تشابهاً كبيراً بين الفلفل العراقي/صورة الأخضر والفلفل الإيراني الأخضر وذلك بامتلاكهما قيمة تشابه عالية، مما يزيد الاعتقاد بأن أصلهما واحد.

## التوصيات Recommendations

1. استعمال توافقات بين البوادي يعدد اكبر في دراسات التباين الوراثي عند استعمال تقانة AFLP-PCR لغرض الكشف بشكل اكبر عن التباينات بين عينات الفلفل او في اية دراسات اخرى على ثمار النباتات المحلية والمستوردة.
2. استعمال عدد اكبر من بوادي المعلم الجزئي SSR لغرض تغطية اوسع لمجين الفلفل، مما يؤدي الى تمييز اكثر دقة بين العينات الحالية المستعملة في هذه الدراسة.
3. اجراء دراسات التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن انتاج البيتا-كاروتين باستعمال تقانة RT-PCR.
4. دراسة جينات اخرى يمكن ان تعتمد كمؤشرات في دراسات التباين الوراثي في النباتات ويمكن ان تحدد تلك الجينات وحسب طبيعة الدراسة واجراء دراسات التسلسل التتابعي لجينات يعتقد بانها مؤشرات على التباين الوراثي في ثمار اخرى مستوردة ومقارنتها مع العينات المحلية .
5. استهلاك ثمار الفلفل ذات النسب العالية من صبغة البيتا-كاروتين لاغناء متطلبات التغذية اليومية لهذه المادة المهمة ذات التأثير المباشر في صحة الإنسان.
6. تعميق الدراسات الجزئية لتشمل انواعا اخرى من النباتات ذات الاهمية الصحية والغذائية.

### REFERENCES

- Abdul Rahim, R. and Mat, I. (2012). Phytochemical contents of *Capsicum frutescens* (chili Padi), *Capsicum annuum* (chili pepper) and *Capsicum annuum* (Bell pepper) aqueous extracts. International Conference on Biological and Life Sciences (IPCBE). 40: 164–167.
- Adetula, O. A. (2006). Genetic diversity of *Capsicum* using random amplified polymorphic DNAs. African J. Biotechnol. 5(2): 120-122.
- Ahmad, M. N., Saleemullah, M., Shah, H. U., Khalil, I. A. and Saljoqi, A. U. R. (2007). Determination of beta carotene content in fresh vegetables using high performance liquid chromatography. Sarhad J. Agric. 23(3): 767-770.
- Aktas, H., Abak, K. and Sensoy, S. (2009). Genetic diversity in some Turkish pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes revealed by AFLP analyses. African J. Biotech. 8(18): 4378-4386.
- Albrecht, M., Klein, A., Huguency, P., Sandman, G. and Kuntz, M. (1995). Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating zeta-carotene desaturation. FEBS Lett. 372: 199-202.
- Andrews, J. (1984). Peppers: The domesticated capsicums. Austin: University of Texas Press.
- Applied Biosystems. (2005). AFLP System Analysis Getting Started Guide. Applied Biosystems, USA.
- Applied Biosystems. (2010). AFLP plant mapping. Applied Biosystems, USA.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Bio. Reporter 9: 208–218.
- Badillo, A., Steppuhn, J., Deruere, J., Camara, B. and Kuntz, M. (1995). Structure of a functional geranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annuum*. Plant Mol. Biol. 27: 425-428.
- Bahurupe, J. V., Sakhare, S. B., Kulwal, P. L., Akhare, A. A. and Pawar, B. D. (2013). Genetic diversity analysis in chilli (*Capsicum annuum* L.) using RAPD markers. The Bioscan. 8(3): 915–918.
- Baral, J. and Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity of *capsicum* germ plasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNAmarkers. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 127: 316-324.

## REFERENCES

---

- Bartley, G. E. and Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoid: pigments for photo protection, visual attraction and human health. *The plant cell*.7: 1027-1038.
- 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.
- Belletti, P., Lanteri, S., Saracco, F. (1992). Allozyme variability in *Capsicum*. In: Proceedings of the Eighth Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* and Eggplant, Rome, Italy, 7–10 September 1992, pp. 221–226.
- Ben-Chaim, A., Grube, R. C., Lapidot, M., Jahn, M. and Paran, I. (2001). Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annum*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1213-1220.
- Blanco-Rios, A. K., Medina-Juárez, L. A., González-Aguilar, G. A. and Gámez-meza, N. (2013). Antioxidant activity of the phenolic and oily fractions of different sweet Bell peppers. *J. Mexican Chem. Soc.* 57(2): 137-143.
- Borovsky, Y., Tadmor, Y., Bar, E., Meir, A., Lewinsohn, E. and Paran, I. (2013). Induced mutation in  $\beta$ -carotene Hydroxylase results in accumulation of  $\beta$ -carotene and conversion of red to orange coloring pepper fruits. *Theor. Appl. Genet.* 126: 557-565.
- Botella-Pavia, P. and Rodriguez-Concepción, M. (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plant.* 126: 369-381.
- Bouvier, F., Backhaus, R. A. and Camara, B. (1998). Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273: 30651-30659.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A. and Camara, B. (1996). Xanthophyll biosynthesis. cloning, expression, Functional reconstitution and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annum*). *J. Biol. Chem.* 271(46): 28861-28867.
- Bouvier, F., Hugueney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M. and Camara, B. (1994). Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: Isolation and molecular cloning of enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6: 45-54.



## REFERENCES

---

- Bozokalfa, M. K., Esiyok, D. and Turhan, K. (2009). Patterns of phenotypic variation in a germplasm collection of pepper (*Capsicum annuum* L.) from Turkey. Spanish J. Agri. Res. 7(1): 83-95.
- Breitenbach, J., Kuntz, M., Takaichi, S. and Sandman, G. (1999). Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type z-carotene desaturase from *Capsicum annuum*. Eur. J. Biochem. 265: 376-383.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (1998). Carotenoids. Biosynthesis and Metabolism. Birkauser verlag. Basel, Switzerland.
- Camara, B. and Dogbo, O. (1986). Demonstration and solubilization of lycopene cyclase from *Capsicum* chromoplast membranes. Plant physiol. 80: 172-174.
- Camara, B., Huguene, P., Bouvier, F., Kuntz, M. and Moneger, R. (1995). Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. Int. Rev. Cytol. 163: 175-247.
- Carol, P. and Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: Implication for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. Trends. Plant Sci. 6: 31-36.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandman, G., Mache, R. Coupland, G. and Kuntz, M. (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene mutants cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. Plant Cell. 11: 57-68.
- Carvalho, S. I. C., Ragassi, C. F., Bianchetti, L. B., Reifschneider, F. J. B., Buso, G. S. C. and Faleiro, F. G. (2014). Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). Genet. Mol. Res. 13(3): 7447-7464.
- Chalhoub, B. A., Thibault, S., Laucou, V., Rameau, C., Höfte, H. and Cousin, R. (1997). Sliver staining and recovery of AFLP (Amplification products on large denaturing poly acrylamide Gels). Biotechniques. 22(2): 216-220.
- Chávez-mendoza, C., Sánchez, E., Carvajal-Millán, E., Muñoz-márquez, E. and Guevara-Aguilar, A. (2013). Characterization of the nutraceutical quality and antioxidant activity in Bell pepper in response to grafting. Molecules. 18: 15689-15703.
- Cheema, S. K. and Pant, M. R. (2013). RAPD analysis of the seven cultivated varieties of *Capsicum annuum* L. J. Pharmacogn. phytochem. 2(1): 152-158.

## REFERENCES

---

- Clark, M. S. (1997). In: Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual, pp 305-328, Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York.
- Conforti, F., Statti, G. A. and Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*). Food Chem.102: 1096-1104.
- Conicella, C., Errico, A. and Saccardo, F. (1990). Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum*. Genome. 33: 279–282.
- Cunningham, F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E. and Hirschberg, J. (1993). Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase , the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene. FEBS Lett. 328(1-2): 130-138.
- Cunningham, F. X., Pogson, B., Sun, Z. R., Mcdonald, K. A., Dellapenna, D. and Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. Plant Cell. 8: 1613-1626.
- Cunningham, F. X., Sun, Z. R., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Gantt, E. (1994). Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cayaobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Plant Cell. 6: 1107-1121.
- da Costa, F. R., Pereira, T. N. S. P., Vitória<sup>1</sup>, A. P., de Campos, K. P., Rodrigues, R., da Silva, D. H. and Pereira, M. G. (2006). Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. Crop Breed. Appl. Biotech. 6: 18-23.
- Davies, B. H., Matthews, S. and Kirk, J. T. O. (1970). Biosynthesis of the carotenoids of different color varieties of *Capsicum annuum* L. phytochemistry. 9(4): 797-805.
- Delgado –Vargas, F. and Peredes- Lopez, O. (2003). Natural colorants for food and Nutraceutical uses. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Deli, J., Matus, Z. and Tóth, G. (1996). Carotenoid composition in the fruits of *Capsicum annuum* cv. szentesikosszarvú during ripening. J. Agric. Food Chem. 44: 711-716.
- Deli, J., Molnár, P., Matus, Z. and Tóth, G. (2001). Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *Lycopersiforme rubrum*)

## REFERENCES

---

- during ripening: Biosynthesis of carotenoids in red paprika. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1517-1523.
- DellaPenna, D. and Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 711-738.
- Dhaliwal, M. S., Yadav, A. and Jindal, S. K. (2014). Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. *African J. Biotechnol.* 13(31): 3137-3143.
- Dias, L. A. S., Marita, J., Cruz, C. D., Barros, E. G. and Salomao, T. M. A. (2003). Genetic distance and its association with heterosis in cacao. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 339-347.
- Dogbo, O., Bardat, F., Laferriere, A., Quennement, J., Brangeon, J. and Camara, B. (1987). Metabolism of plastid terpenoids: Biosynthesis in plastid stroma isolated from higher plants. *Plant Sci.* 49: 89-101.
- Dogbo, O. and Camara, B. (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranyl geranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* 920: 140-148.
- 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.
- Ellis, R. P., Mcnicol, J. W., Baird, E., Booth, A., Lawrence, P., Thomas, B. and Powell, W. (1997). The use of AFLP<sub>s</sub> to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.* 3: 359-369.
- Eshbaugh, W. H. (1993). Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In Janick J, Simon, J. F., editors. *New crops*. New York, USA: Wiley pp.132-139.
- FAO. (2010). The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome 370p. <http://www.Fao.org>.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W. and Bramely, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (Evidence for tissue – specific gene expression). *Plant physiol.* 105(1): 405–413.
- Garcia-Martinez, S., Andreani, L., Garcia- Gusano, M., Geuna, F. and Ruiz, J. J. (2006). Evaluation of Amplified fragment length polymorphism and simple

## REFERENCES

---

- sequence repeats for tomato germplasm finger printing: utility for grouping together closely related traditional cultivars. *Genome*. 49: 648-656.
- Geleta, L. F., Labuschagne M. T., 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.
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev.* 24: 1-44.
- Gómez-García, M. D. R. and Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.) *Int. J. Mol. Sci.* 14: 19025-19053.
- Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T., Karasawa, M. and Sudré, C. P. (2008). Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accession. *Genet. Mol. Res.* 7: 1289-1297.
- Gorinstein, S., Yong-seo, P., Buk-Gu, H., Namiesnik, J., Leon-towicz, H., Leontowicz, M., Kyung-sik, H., Ja-yong, C. and seong-Gook, K. (2009). A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *Eur. Food Res. Tech.* 228(6): 903-911.
- Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P. W. and O'Connell, M. A. (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179(1-2): 49-59.
- Ha, S. H., Kim, J. B., Park, J. S., Lee, S. W. and Cho, K. J. (2007). A comparison of the carotenoid accumulation in capsicum varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin–capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.* 58: 3135-3144.
- Hadden, W. L., Watkins, R. H., Levy, L. W., Regalado, E., Rivadeneira, D. M., Van Breemen, R. B. and Schwartz, S. J. (1999). Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *J. Agri. Food Chem.* 47: 4189–4194.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

## REFERENCES

---

- Hallmann, E. and Rembialkowska, E. (2008). The content of selected Antioxidant compounds in bell pepper varieties from organic and conventional cultivation before and after freezing process. 16<sup>th</sup> IFOAM organic world congress. Modena, Italy. Archived at <http://orgprints.org/12516>.
- Hallmann, E. and Rembialkowska, E. (2012). Characterization of antioxidant compounds in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under organic and conventional growing system. J. Sci. Food Agric. 92: 2409-2415.
- 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.
- Haná ek, P., Vyhnánek, T., Rohrer, M., Cieslarova, J. and Stav líkova, H. (2009). DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. Hort Sci. (PRAGUE). 36: 127-132.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. Trendsplant Sci. 3: 147–151.
- Hayashi, E., Chi, H. C., Boyer, S. K. and Still, D. W. (2005). Amplified fragment length polymorphism protocol for plant science on CEQ series genetic analysis system. Beckmancoulter, Inc. California. [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com).
- Hervet–Hernandez, D., Sayago–Ayerdi, S. G. and Goni, I. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bio accessibility. J. Agri. Food Chem. 58(6): 3399 – 3406.
- Hill, T. A., Ashrafi, H., Reyes-chin-wo, yao, J., Stoffel, K., Truco, M. J., Kozik, A., Michelmore, R. W. and Vandeynze, A. (2013). Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with 30k unigene pepper Genechip. Plos ONE8(2): e56200.
- Hiroaki, E., Hiroyuki, I., Tadashi, T. and Shigera, I. (2000). Genetic diversity of the peruvianum complex (*Lycopersicon peruvianum* L. Mill and *Lycopersicon chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. Euphytica. 116: 23-31.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Current opinion plant Biol. 4: 210–218.

## REFERENCES

---

- Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V. and Pecker, I. (1997). Molecular genetics of the carotenoid bio synthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 69(10): 2151–2158.
- Hornero–Mendez, D., Gomez–Ladron de – Guevara, R. and Minguez–Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening: cultivar selection for breeding, *J. Agri. Food chem.* 48: 3857–3864.
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H. and Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* sp.) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1713-1720.
- Huguene, P., Badillo, A., Chen, H., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B. and Kuntz, M. (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: A model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chloroplasts. *Plant J.* 8: 417-424.
- Huguene, P., Römer, S., Kuntz, M. and Camara, B. (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and Z-carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* 209: 399-407.
- Huh, J. H., Kang, B. C., Nahm, S. H., Kim, S., Ha, K. S., Lee, M. H. and Kim, B. D. (2001). A candidate gene approach Identifies phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* SSP.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 524-530.
- Hurtado-Hernandez, H. and Smith, P. G. (1985). Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. *J. Hered.* 76: 211-213.
- Ince, A. G., Karaca, M. and Onus, A. N. (2009). Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genet. Res. Crop.* 6: 211-221.
- Ince, A. G., Karaca, M. and Onus, A. N. (2010). Genetic relationships within and between *Capsicum* species. *Biochem. Genet.* 48: 83-95.
- International plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (1995). Descriptors' para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Intitute (IPGRI), Rome, Italy.

## REFERENCES

---

- 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.
- Jensen, R. J., McLeod, M. J., Eshbaugh, W. H., and Guttman, S. I. (1979). Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxonomy*. 28: 315-327.
- Jordan, B. R. (2006). *The molecular biology and biotechnology*. 2<sup>nd</sup> ed. CABI publishing: Cambridge. MA. USA.
- Josse, E. M., Sim Kin, A. J., Gaffe, J., Laboure, A. M., Kuntz, M. and Acarol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant physiol*. 123: 1427–1436.
- Jung, J. K., Park, S. W., Liu, W. Y. and Kang, B. C. (2010). Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica*.175: 91-107.
- Kafkas, S., Ozkan, H. and Sutyemez, M. (2005). DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in Walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 130(4): 585-590.
- Kang, B. C., Nahm, S. H., Huh, J. H., Yoo, H. S. and YU, J. W. (2001). An interspecific (*Capsicum annuum* X *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet*. 102: 531-539.
- Kang, T. J. and Yang, M. S. (2004). Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic. *BMC Biotechnol*. 4(20): 1-12.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. and Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol*. 134(2): 824–837.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol*. 36: 703-725.
- Kevresan, Z. S., Mandic, A. P., Kuhajda, K. N. and Sakac, M. B. (2009). Carotenoid content in fresh and dry pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits for paprika production. *Food process Qual Saf*. 1-2: 21–27.
- Keyhaninejad, N., Richins, R. D. and O'Connell, M. A. (2012). Carotenoid content in field-grown versus greenhouse-grown peppers: Different responses in leaf and fruit. *Hort Sci*. 47(7): 852-855.

## REFERENCES

---

- Kim, O. R., Cho, M. C., Kim, B. D. and Huh, J. H. (2010). A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orang coloration in Habanero pepper fruits. *Mol. Cells*. 30: 569-574.
- 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.
- Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., Luna Ruiz, J. J., Eeckenbrugge, G. C., Hijmans, R. J. and Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 111(17): 6165-6170.
- Krap, A., Seberg, O. and Buiatti, M. (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.*78: 143-149.
- Krishnamurthy, S. L., Mohan, R. A., Reddy, M. K., Ramesh, S., Hihalmani, S. H. and Raom, G. (2012). Relationship between morphological and amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker based genetic distance with hetrosis in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *African J. Biotechnol*. 11(74): 13863-13872.
- Krishnamurthy, S. L., Prashanth, Y., Rao, A. M., Reddy, K. M. and Ramachandra, R. (2015). Assessment of AFLP marker based genetic diversity in chilli (*Capsicum annuum* L. & *C. baccatum* L.). *Indian J. Biotech*. 14: 49-54.
- Krishnamurthy, S. L., Rao, A. M., Reddy, M. K., Reddy, S., Ramesh, S., Hittalmani, S. and Rao, M. G. (2013). Limits of parental divergence for the occurrence of heterosis through morphological and AFLP marker in chili *Capsicum annuum* L. *Curr. Sci*. 104(6): 738-746.
- Kumar, N. S. and Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci. Vis*. 11 (3): 116-124.
- Kumar, S. and Rai, M. (2005). Chile in India. Chile pepper. *Institute Newsletter* (XXII):1-3.
- Kumari, S. (2013). Genetic variability studies in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Asian J. Horticulture*. 8(1): 280-284.
- Kuntz, M., Römer, S., Suire, C. Huguency, P., Weil, J. H., Schantz, R. and Camara, B. (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranyl geranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative



## REFERENCES

---

- increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.* 2: 25-34.
- 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.
- Lai, J., Li, R., Xu, X., Jin, W., Xu, M., Zhao, H., Xiang, Z., Song, W., Ying, K., Zhang, M., Jiao, Y., Ni, P., Zhang, J., Li, D., Guo, X., Ye, K., Jian, M., Wang, B., Zheng, H., Liang, H., Zhang, X., Wang, S., Chen, S., Li, J., Fu, Y., Springer, N. M., Yang, H., Wang, J., Dai, J., Schnable, P. S. and Wang, J. (2010). Genome -Wide patterns of genetic variation among elite maize inbred line *Nat. Genet.* 42(11): 1027-1030.
- Lang, Y. Q., Yanagawa, S., Sasanuma, T. and Sasakuma, T. (2004). Orange fruit color in *capsicum* due to deletion of capsanthin-capsorubin synthesis gene. *Breed. Sci.* 54: 33-39.
- Lanteri, S., Acquadro, A., Quagliotti, L. and Portis, E. (2003). RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-west Italy. *Genet. Res. Crop Evol.* 50: 723-735.
- 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.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet. Res. Crop Evol.* 56: 277-292.
- 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.
- 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.
- Lefebvre, V., Kuntz, M., Camara, B. and palloix, A. (1998). The capsanthin-capsorubin synthase gene: A candidate gene for the Y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol. Biol.* 36: 785-789.

## REFERENCES

---

- Lefebvre, V., Palloix, A. and Rives, M. (1993). Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*. 71: 189-199.
- Li, L. and VanEck, J. (2007). Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Res.* 16: 581–585.
- Li, Z., WANG, S., Gui, X. L., Chang, X. B. and Gong, Z. H. (2013). A further analysis of the relationship between yellow ripe fruit color and the capsanthin-capsorubin synthase gene in pepper (*Capsicum* sp.) indicated a new mutant variant in *C. annuum* and a Tandem repeat structure in promoter region. *PlosONE*. 8(4): e61996.doi.:10.1371\Journal. pone. 006 1996.
- Lin, J. J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., Macdonald, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N. and Matthews, B. F. (1996). Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 14(2): 156-169.
- Litt, M. and Luty, J. A. (1989). A hyper variable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Loaiza-Figueroa, F., Ritland, K., Laborde-Cancino, J. A., and Tanksley, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Syst. Evol.* 165: 159-188.
- Lucchese, C., Dinelli, G., Miggiano, A., Lovato, A. (1999). Identification of pepper (*Capsicum* spp.) cultivars by field and electrophoresis tests. *Seed Sci. Technol.* 27: 37–47.
- Makari, H. K., Ravikumar, H. S., Abhilash, M. and Mohan K. H. D. (2009). Genetic diversity in commercial varieties of chilli as revealed by RAPD method. *Indian J. Sci. Technol.* 2(4): 91-94.
- Maoka, T., Mochida, K. and Kozuk, M. (2001). Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *cancer letters*. 172: 103-109.
- Marcela, C. and Amaya, R. B. D. (2003). Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *J. Food Chem.* 83: 595-600.
- Marin, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. and Gill, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* 52: 3861-3869.

## REFERENCES

---

- Marty, I., Bureau, S., Sarkissian, G., Gouble, B., Audergon, J. M. and Albagnac, G. (2005). Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *J. Exp. Bot.* 56(417): 1877-1886.
- Matsufuji, H., Ishikawa, K., Nunomura, O., Chino, M. and Takeda, M. (2007). Antioxidant content of different coloured sweet pepper, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.* 42: 1482-1488.
- Matus, Z., Deli, J. and Szabolcs, J. (1991). Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: Isolation of  $\beta$ -cryptoxanthin 5,6-epoxide. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1907-1914.
- Mimura, Y., Inoue, 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. *Breed. Sci.* 62: 93-98.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M. and Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed.* 18: 157-169.
- Moscone, E. A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F., *et al.* (2003). Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Ann. Bot.* 92: 21-29.
- Moscone, E. A., Lambrou, M., Hunziker, A. T. and Ehrendorfer, F. (1993). Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systemat. Evol.* 186: 213-229.
- Nadeem, M., Anjum, F. M., Rafiqkhan, M., Saeed, M. and Riaz, A. (2011). Antioxidant potential of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) A review. *PAK. J. Food Sci.* 21(1-4): 45-51.
- 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.
- Naik, P. S., Chanemoug Asound Haram, A. Paul Khurana, S. M. and Kalloo, G. (2003). Genetic manipulation of carotenoid path way in higher plants. *Curr. Sci.* 85(10): 1423-1430.
- Nicolai, M., Cantet, M., Lefebvre, V., Sagepalloux, A. M. and Palleux, 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

## REFERENCES

---

- structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60: 2375-2390.
- 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.
- Niyogi, K. K. (1999). Photo protection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- Odeigah, P. G. C., Oboh, B., Ahhalokpe, I. O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum*, and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Genet. Res. Crop Evol.* 46: 127–131.
- 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.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Abdel-Migid, H., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F. and Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon.* 57(4): 1159-1181.
- Ortiz, R., Delgado delaflora, F., Alvarado, G. and Crossa, J. (2010). Classifying vegetable genetic resources-A case study with domesticated *Capsicum* spp. *Sci. Hort.*126: 186-191.
- 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.
- Ozgur, M., Oz an,T., Akpinar-Bayizit, A. and Yilmaz-Ersan, L. (2011). Functional compounds and antioxidant properties of dried green and red peppers. *African J. Agri. Res.* 6(25): 5638-5644.
- 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.

## REFERENCES

---

- Panda, R. C., Kumar, O. A., Raja Rao, K. G. (1986). The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationships in chili pepper (*Capsicum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 665–670.
- Panda, R. C., Kumar, O. A. and Raja Rao, K. G. (2004). Cytogenetic studies of some F1 hybrids between wild and cultivated taxa of *Capsicum* L. *Cytologia* 69: 203-208.
- Paran, I. and Knaap, V. D. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J. Exper. Bot.* 58: 3841-3852.
- Paran, I., Aftergoot, E., Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-173.
- Pavia, S. A. R. and Russell, R. M. (1999). -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Amer. Collage Nut.* 18: 426–433.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F. and Hirschberg, J. (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 30: 807-819.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. G., Rademaker, K., Ranere, A. J., Raymond, J. S., Sandweiss, D. H., Scaramelli, F., Trable, K. and Zeidler, J. A. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp.) in the Americas. *Science.* 315: 986-988.
- Pickersgill, B. (1971). Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution.* 25: 683-691.
- Pickersgill, B. (1977). Chromosomes and evolution in *Capsicum*. In *Capsicum* 77. Edited by E. Pochard. INRA Montfavet-Avignon, France.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica.* 96: 129-133.
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas insights from mendelian and molecular genetics. *Ann. Bot.*100: 925-940.
- Popovsky, S. and Paran, I. (2000). Molecular genetics of the Y locus in pepper: Its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *Theor. Appl. Genet.* 101: 86-89.

## REFERENCES

---

- Portis, E., Acquadro, A., Comino, C. and Lanteri, S. (2004). Effect of farmer's seed selection on genetic variation of landrace population of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-west Italy. *Genet. Res. Crop Evol.* 51: 581-590.
- Portis, E., Nagy, I., Sasvari, Z., Stigel, A., Brachi, L. and Lanteri, S. (2007). The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Sci.* 172: 640-648.
- Posch, A., Van den Berg, B. M., Duranton, C., Görg, A. (1994). Polymorphism of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed proteins studied by two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: methodical and genetic aspects. *Electrophoresis* 15: 297-304.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 3: 225-238.
- Prasad, B., Gulabkhan, R., Radha, T., Ravi, C. H., Venkataiah, P., Subhash, K. and Christopher Reuben, T. (2013). DNA profiling of commercial chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) Varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African J. Biotechnol.* 12(30): 4730-4735.
- Prince, J. P., Lackney, V. K., Angeles, C., Blauth, J. R., Kyle, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome.* 38: 224-231.
- Prince, J. P., Loaiza-Figueroa, F. and Tanksley, S. D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. *Genome.* 35: 726-732.
- 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.
- Rambialkowska, E., Hallmann, E. and Wasiak-Zys, G. (2003). Nutritive and sensory quality of tomatoes from organic and conventional cultivation. *Zywienie Czlowieka I Metabolizm.* 30(3): 893-899.
- Rana, M., Sharma, R., Sharma, P., Bhardwaj, S.V. and Sharma, M. (2014). Estimation of genetic diversity in *Capsicum annuum* L. germplasm using PCR based molecular markers. *Nat. Acad. Sci. Letters.* 37(3): 295-301.

## REFERENCES

---

- Reddy, M. K., Srivastava, A., Kumar, K. R., Chawda, N., Ebert, A. W. and Vishwakarma, M. (2014). Chilli (*Capsicum annuum* L.) breeding in India: an overview. *Sabrao J. Breed. Genet.* 46(2): 160-173.
- Rodriguez, 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.
- 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.
- Rodriguez-Urbe, L., Cuzman, I., Rajapakse, W., Richins, R. D. and O., Connell, M. A. (2012). Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum* fruit, regulated at multiple levels. *J. Exp. Bot.* 63(1): 517-526.
- Rumeau, D., Peltier, G. and Cournac, L. (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photo synthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ.* 30: 1041-1051.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor. New York. USA.
- Sanatombi, K., Sen-Mandi, S. and Sharma, G. J. (2010). DNA profiling of *Capsicum* Landraces of Manipur. *Sci. Horticult.* 124: 405-408.
- Saunders, J. A., Sue Mischke, S. and Alaa A. Hemeida, A. A. (2001). The use of AFLP techniques for DNA fingerprinting in plants. Application information. Beckman Coulter, Inc. A-1910A.
- Sensoy, S., Aktas, H. and Abak, K. (2009). Genetic diversity in some Turkish pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes revealed by AFLP analyses. *African J. Biotechnol.* 8(18): 4378-4386.
- Shaha, R. K., Rahman, S. H. and Asrul, A. (2013). Bioactive compounds in chilli peppers (*Capsicum annuum* L.) at various ripening (green, yellow and red) stages. *Ann. Bio. Res.* 4(8): 27-34.
- Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M. and Levy, J. (2012). Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: *Arev. Mol. Nut. Food Res.* 56: 259-269.

## REFERENCES

---

- Shotorbani, N. Y., Jamei, R. and Heidari, R. (2013). Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and effect of thermal treatment. *Avicenna J. Phytomedicine*. 3(1): 25-34.
- Sikora, B. and Nowaczyk, P. (2014). Application of RAPD technique for identification of interspecific hybrids from Genus *Capsicum*. *Acta Sci. Pol.* 13(1): 155-166.
- 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.
- Skelton, R. L., Yu, Q., Srinivasan, R., Manshardt, R., Moore, P. H. and Ming, R. (2006). Tissue differential expression of lycopene  $\beta$ -cyclase gene in papaya. *Cell Res.* 16: 731-739.
- Smith, J. S. C. and Williams, J. G. K. (1994). Arbitrary primer mediated finger print in plants: Case studies in plant breeding, taxonomy and phylogeny. *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. 69:5-15.
- Snigir, E. A., Pyshnaya, O. N., Kochieva, E. Z. and Ryzhova, N. N. (2013). AFLP-analysis of varietal polymorphism in *Capsicum annuum* L. *Selskokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology)*. 1: 53-60.
- 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. *Genet. Engin. Biotechnol. J.* 11: 1-10.
- 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.
- Stágel, A., Gyurjan, I., Sasvari, Z., Lanteri, S., Ganal, M. and Nagy, I. (2009). Patterns of molecular evolution of microsatellite loci in pepper (*Capsicum* spp.) revealed by allele sequencing. *Plant system. Evol.* 281: 251-254.
- Stahl, W. and Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspe. Med.* 24(6): 345-351.
- Sudré, C. P., Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T., Riva-Souza, E. M. and Bento, C. D. S. (2010). Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet. Mol. Res.* 9(1): 283-294.



## REFERENCES

---

- Sun, T., Xu, Z., Wu, C. T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W. and No, H. K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet Bell peppers (*Capsicum annuum* L.). J. Food Sci. 72: 98–102.
- 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.
- 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.
- Tang, H., Sezen, U. and Paterson, A. H. (2010). Domestication and plant genome. Curr. Opin. Plant Biol. 13: 160-166.
- Tanksley, S. D. and Mc Couch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science. 277: 1063-1066.
- Taylor, M. and Ramsay, G. (2005). Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plants food quality. Physiol. Plant. 124: 143–151.
- Thorup, T. A., Tanyolac, B., Livingstone, K. D., Popovsky, S., Paran, I. and Jahn, M. (2000). Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the solanaceae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 11192-11197.
- Thul, S. T., Darokar, M. P., Shasany, A. K. and Khanuja, S. P. (2011). Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. Mol. Biotechnol. 51(2): 137-147.
- Thul, S. T., Lal, R. K., Shasany, A. K., Darokar, M. P., Gupta, A. K., Gupta, M. M., Verma, R. K. and Khanuja, S. P. S. (2009). Estimation of phenotypic divergence in a collection of *Capsicum* specie for yield related traits. Euphytica. 168: 189-196.
- Tian, S. L., Li, L., Chai, W. G., Shah, S. N. M. and Gong, Z. H. (2015). Effect of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits. BMC Plant Biol. 14: 314-325.
- Tilahun, S., Paramaguru, P. and Kannan Bapu, J. R. (2013). Genetic diversity in certain genotypes of chilli and paprika as revealed by RAPD and SSR analysis, Asian J. Agric. Sci. 5(2): 25–31.

## REFERENCES

---

- Toquica, S. P., Rodriquez, F., Martinez, E., Duque, M. C., 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.
- Turnpenny, P. and Ellard, S. (2005). Emery's elements of medical Genetics. 12<sup>th</sup>.ed Elsevier, London.
- 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.
- Vellve, R. (1993). The decline of diversity in European agriculture. Ecologist. 23: 64-69.
- Vonlting, J. and Vogt, K. (2004). Vitamin A formation in animals: Molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes, J. Nut. 134: 251–256.
- 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.
- Votava, E. J. and Bosland, P. W. (2002). A cultivar by any other name: Genetic variability in Heirloom bell pepper "California wonder". Hort Sci. 37(7): 1100-1102.
- Vuylsteke, M., Pelema, J. D. and VanEijk, M. J. T. (2007). Technology for DNA finger printing. Nature protocols. 2: 1387-1398.
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Tikunov, Y., Devos, R. C. H., Pelgrom, K. T. B., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, R. J. and Bovy, A. G. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. Metabolomics. 9(1): 130-144.
- Weedon, B. C. L. and Moss, G. P. (1995). Nomenclature of carotenoids: IUPAC-IUB Rules. In "carotenoids, vol.1 A: Isolation and analysis" edited by Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. Basel, Switzerland.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications. 2<sup>nd</sup> Edition, CRC press.
- Williams, C. E. and Clair, D. A. (1993). Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and

## REFERENCES

---

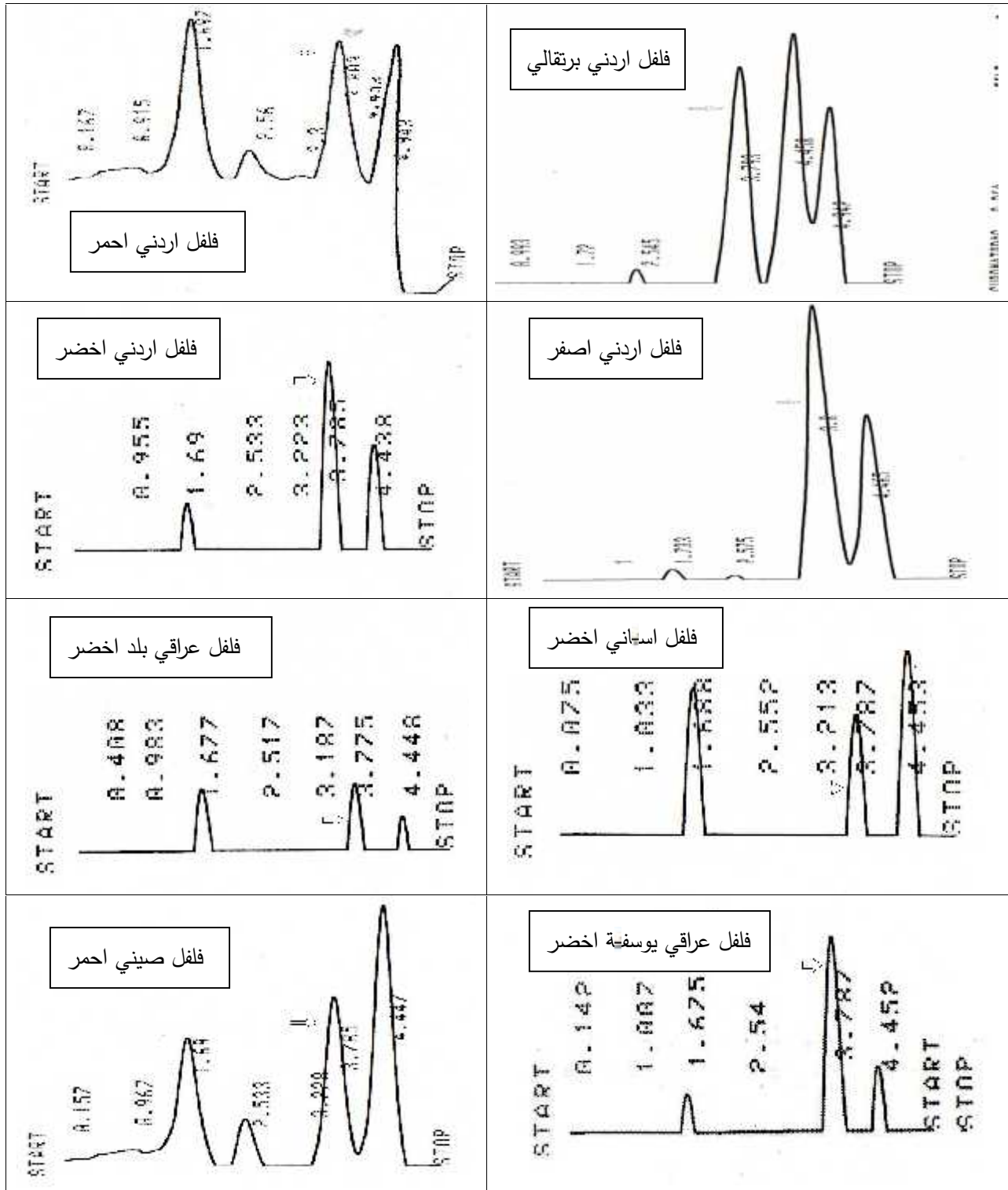
- random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*. 36(3): 619-630.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Raflaski, J. A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleicacids Res.*18(22): 6531-6535.
- Young, H. P., Marilyn, A. L., West, M. A. and Stclair, D. A. (2004). Evaluation of AFIPs for germplasm finger printing and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum*) *Genome*.47: 510-518.
- Yüzbaıodlu, E., Özcan, S. and A ik, L. (2006). Analysis of genetic relationships among Turkish cultivars and breeding lines of *Lens ulinatis* mestile using RAPD markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 507-514.
- Zabeau, M. and Vos, P. (1993). European patent application, publication no: EP0534858.
- Zhang, D. and Hauzu, Y. (2003). Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell pepper. *J. Food Agri. Environ.* 1(2): 22-27.
- 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. *Candian. J. Plant Sci.* 87: 763-771.
- Zhao, S., Tuan, P.H. A., Kim, J. K., Park, W. T., Kim, Y. B., Arasu, M. V., AL-Dhabi, N. A., Yang, J., Li, C. H. and Park, S. U. (2014). Molecular characterization of carotenoid biosynthetic genes and carotenoid accumulation in *Lycium chinense*. *Molecules.* 19: 11250-11262.
- Zhu, C., Naqvi, S., Capell, T. and Christou, P. (2009). Metabolic engineering of Ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 182–190.

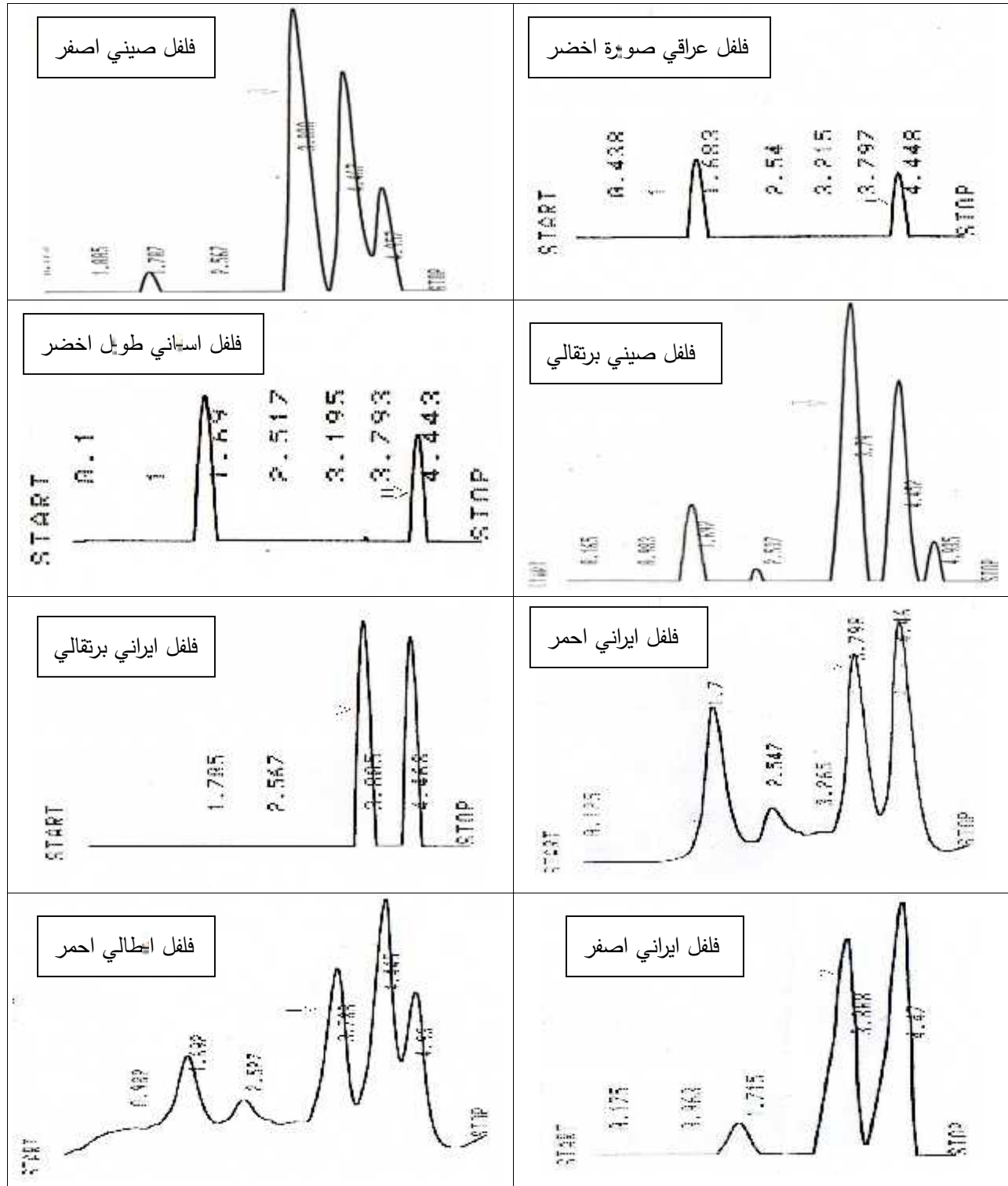
## البحوث المستلة من الرسالة والمقبولة للنشر

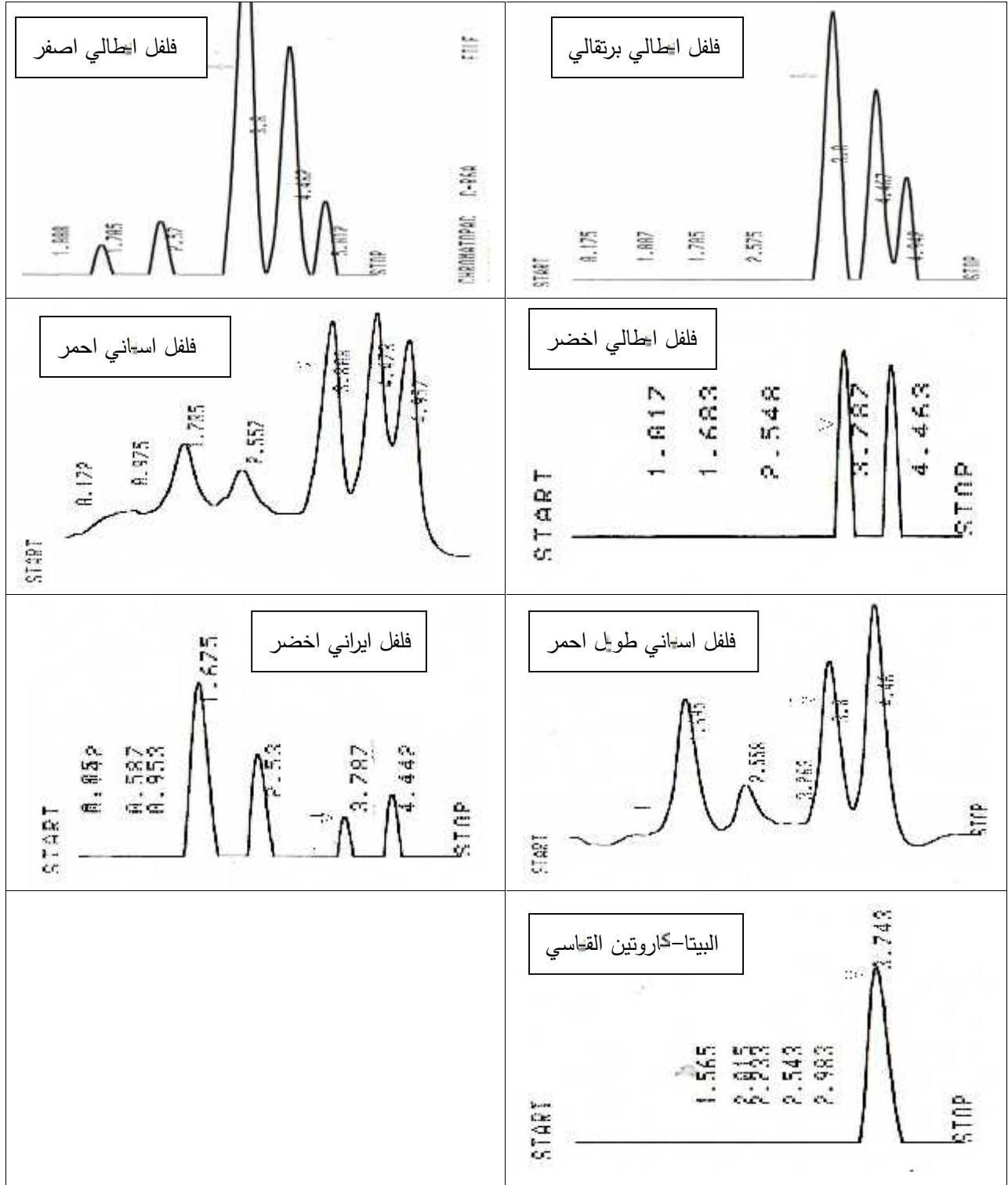
حسين، احسان عرفان ومهدي، شيماء صباح. (2015). التباين الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق باعتماد تقانة RAPD-PCR. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. 28(3):383-398.

حسين، احسان عرفان ومهدي، شيماء صباح. (2016). تقانة SSR-PCR في تعيين التنوع الوراثي لثمار الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. لعينات محلية ومستوردة في العراق. مجلة كلية التربية الأساسية. مقبول للنشر.

ملحق (1): المنحنيات الخاصة بتراكيز البيتا-كاروتين في عينات الفلفل المدروسة باستعمال تقانة HPLC







ملحق (2): رموز النيكلوتيدات الخاصة بالاتحاد الدولي للكيمياء الصرفة والتطبيقية IUPAC والمستعملة في دراسات التسلسل التتابعي للدنا

القاعدة النايروجينية	رمز النيكلوتيدة بنظام IUPAC
T or C (Pyrimidine)	Y
G or A (Purine)	R
A or C (Amino)	M
G or T (Keto)	K
G or C (Strong interaction: 3 H bonds)	S
A or T (Weak interaction: 2 H bonds)	W
G or T or C (Not A)	B
G or C or A (Not T, Not U)	V
G or A or T (Not C)	D
A or C or T (Not G)	H
G or A or T or C (Unknown nucleotide)	N



## Summary

Genetic variation was studied in 22 local and imported samples of bell pepper fruits *Capsicum annuum* L., which collected from local Iraqi market by using some molecular markers. Estimation of carotenoids by using high-performance liquid chromatography (HPLC) was done in all samples. Detection of three genes; Lycopene -cyclase (*Lcyb*), -carotene hydroxylase (*Crtz-2*) and Capsanthin-capsorubin synthase (*Ccs*), were also studied and the DNA sequencing was done for these genes.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was studied for three selective amplification primers in all samples. The first selective amplification primer ( $E_{ACG}/M_{AGG}$ ) produced 4 bands for the studied bell pepper fruits with 3 monomorphic bands in each sample, except the orange and yellow Jordanian bell pepper samples, which produced 4 bands one of them polymorphic band with 25% ratio and 21.43% primer efficiency with 100% discriminatory power. The second selective amplification primer ( $E_{AAG}/M_{AAT}$ ) produced 4 monomorphic bands in each sample with no polymorphic bands with 28.57% primer efficiency and 0% discriminatory power, whereas the third selective amplification primer ( $E_{ACA}/M_{CTG}$ ) produced 7 monomorphic bands in each sample, except the Iraqi/Balad green bell pepper, which produced 3 monomorphic bands with no polymorphic bands and the primer efficiency is 50% with 0% discriminatory power. The results of Dendrogram of the studied samples by using Jaccard coefficient for genetic similarity was distributed the samples into 3 main groups. The first group was included the red and orange Jordanian bell pepper fruits samples, whereas the second group included the Iraqi/Balad green bell pepper and the third group included the rest samples. The results of this distribution revealed a high similarity between red and orange Jordanian bell pepper and the other bell pepper samples, except Iraqi/Balad green bell pepper with 0.94 values. This value is the higher, whereas the similarity with the Iraqi/Balad green bell pepper is 0.68 values. The genetic distance between studied samples revealed the highest values between red and orange Jordanian bell pepper and the Iraqi/Balad green bell pepper with 2.236 values.

Six primers were used with single sequence repeat (SSR-PCR) technique. These primers produced 33 bands. The number of polymorphic bands is 24, whereas the number of monomorphic bands is 9. The results of Dendrogram of the studied samples 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. The genetic distance between the studied samples 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 random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) was used five randomly primers. The percentage of polymorphic bands is 100%, with one distinguished band which is produced by using C52 primer with 1800 base pair. The other primers did not produce any distinguished band. The results of Dendrogram of the studied samples by using Jaccard coefficient for genetic similarity was distributed the samples into 8 groups. This Dendrogram revealed a higher similarity between Iraqi/Yousifia green bell pepper and Jordanian yellow bell pepper with 0.84 values. This value is the highest between samples in comparison with lowest values (0.0) which are found between Iranian yellow bell pepper and the other samples. The genetic distance between studied samples revealed the highest values between Chinese yellow bell pepper and Iranian green bell pepper with 5.0 values, in comparison with the lowest genetic distance between Spanish green bell pepper and Italian yellow bell pepper with 1.0 value.

The higher value of  $\beta$ -carotene concentration was found in Italian yellow bell pepper sample with 1415.73  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in comparison with 94.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , which is estimated in Iranian green bell pepper. The highest concentration values of  $\beta$ -carotene in yellow bell pepper was found in Italian sample, in comparison with the

lowest value for the same color, which found in Iranian yellow bell pepper with 710.89  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The highest concentration value of  $\beta$ -carotene in orange bell pepper was found in Italian sample with 898.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in comparison with 574.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Iranian orange bell pepper sample. The red bell pepper was estimated lowest concentration of  $\beta$ -carotene with 245.27  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Jordanian red bell pepper, in comparison with highest value in Spanish red bell pepper with 435.41  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The green bell pepper was estimated highest concentration of  $\beta$ -carotene in Italian green bell pepper with 232.43  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in comparison with lowest value with 98.86  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Iraqi/Souwyera green bell pepper sample.

Some of genes which related with  $\beta$ -carotene production were detected in all samples by using Polymerase chain reaction (PCR), and the products produced by this approach were resolved on 2% agarose gels. The *Lcyb* gene was detected in 11 bell pepper samples by using the external primers, whereas the gel electrophoresis for this gene revealed amplified band with 360 base pair in 19 bell pepper samples when internal primer was used. The *Crtz* gene was detected in Iraqi/ Souwyera green bell pepper sample with amplified band more than 1500 base pair by using the external primers, whereas the gel electrophoresis for this gene revealed amplified band with 760 base pair in 3 bell pepper samples; Jordanian orange bell pepper, Iraqi/ Yousifia green bell pepper and Iranian green bell pepper when internal primer was used. The *Ccs* gene was detected by using the external primers in Iraqi/ Souwyera green bell pepper and Italian orange bell pepper with amplified band more than 1500 base pair, whereas the gel electrophoresis for this gene revealed amplified band with 490 base pair in 7 bell pepper samples when internal primer was used.

The DNA sequences results for the *Lcyb* gene in some green bell pepper samples revealed high similarity between its nucleotides and Refseq for the same gene, with some differences in nucleotide sequences for some bell pepper samples. The highest similarity between nucleotide sequences was found between Iraqi/Souwyera green bell pepper sample and Iranian green bell pepper sample with 0.903 value, whereas the lowest similarity was found in Jordanian yellow bell pepper and Chinese yellow with 0.539 value. The nucleotide sequences results for the *Crtz* gene revealed two types of genetic changes, such as deletion and

substitution in Jordanian orange bell pepper. The results found substitution in the guanine (G) nucleotide base with thymine (T) nucleotide base in 846 and 850 positions. Also, substitute the thymine nucleotide base with the cytosine (C) nucleotide base in the 852, 860 and 861 positions. Substitution also found in the cytosine nucleotide base with adenine (A) nucleotide base in the 856, 862 position, and substitute the cytosine nucleotide base with the thymine nucleotide base in the 864 and 870 positions. Deletions of nucleotide bases was also found like ATA sequence in the *Crtz* gene of Jordanian orange bell pepper in comparison with the standard nucleotide sequence (Refseq) for the same gene. The nucleotide sequences results for the *Ccs* gene in some bell pepper samples revealed high similarity with the standard nucleotide sequence (Refseq) for the same gene with some differences in some nucleotide bases of the studied samples, like substitution. The highest similarity between nucleotide sequences for the *Ccs* gene was found between Italian yellow and green bell pepper samples with 0.966 values, whereas the lowest similarity was found in Iraqi/Balad green bell pepper with 0.611 values.

**Republic of Iraq**

**Ministry of Higher Education**

**and Scientific Research**

**University of Baghdad**

**College of Education for Pure Sciences/Ibn-AL-Haitham**



**Genetic diversity study for different varieties of sweet pepper *Capsicum annuum* L. for samples from local markets by using some molecular genetic techniques**

**A thesis**

**Submitted to the College of Education for Pure Sciences/Ibn-Alhaitham University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy in Science  
Biology / Botany / Genetics**

**By**

**Shayma Sabah Mahdi**

**M.Sc. in Biology – College of Science - Baghdad University**

**2004**

**Supervisor**

**Assist. Prof. Dr. Ihsan Arfan Hussein**

**2016 A.D**

**1437 A.H**