

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО ЗЕЛЕНЧУКОВИ КУЛТУРИ “МАРИЦА”
гр. Пловдив

Величка Володиева Спасова-Апостолова

МОЛЕКУЛЯРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА КОЛЕКЦИЯ ОТ МУТАНТИ И
БЛИЗКОРОДСТВЕНИ ФОРМИ ПИПЕР

Автореферат

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научно направление 6.1. „Растениевъдство“.

Научна специалност - „Селекция и семепроизводство на културните растения“.

Научни ръководители:

Проф. д-р Нася Борисова Томлекова

Доц. д-р Ивелин Йорданов Панчев

ПЛОВДИВ

2017 г.

Дисертациония труд е написан на 162 страници и съдържа 41 фигури, 19 таблици и 6 приложения към дисертацията. В списъка с цитирана литература са посочени 261 източника, от които 10 на кирилица и 251 на латиница.

Експерименталната работа е изведена в лаборатория по молекулярна биология в Институт по зеленчукови култури „Марица“, гр. Пловдив, през периода 2013 - 2016 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание проведено на 25.07.2017 г. на отдел „Селекция, сортоподдържане и интродукция“ при Институт по зеленчукови култури „Марица“, гр. Пловдив.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 11 октомври 2017 г. от 11:00 часа в заседателната залата на Института по зеленчукови култури „Марица“, гр. Пловдив пред Научно жури, назначено от Председателя на ССА със заповед № НП-08-85/11.08.2017 год. в състав:

1. Проф. д-р Нася Томлекова – ИЗК „Марица“, гр. Пловдив
2. Доц. д-р Станислава Грозева-Тилева – ИЗК „Марица“, гр. Пловдив
3. Проф. д-р Илия Денев – ПУ, гр. Пловдив
4. Проф. д-р Елена Тодоровска – АБИ, гр. София
5. Доц. д-р Божин Божинов – АУ, гр. Пловдив

Материалите по защитата са на разположение в Институт по зеленчукови култури „Марица“, гр. Пловдив.

Списък на използваните съкращения

CrtZ – Beta-Carotene Hydroxylase (Бета-каротен хидроксилаза/ген)

CrtZ_{chr03} – Бета-каротен хидроксилазен ген локализиран на трета хромозома

CrtZ_{chr06} – Бета-каротен хидроксилазен ген локализиран на шеста хромозома

ISAP – inter-SINE amplified polymorphism (Полиморфизъм на амплифицирани междутранспозонни области).

PDS/*Pds* – Phytoene Desaturase (Фитоен десатураза/ген)

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (Случайно амплифицирана полиморфна ДНК)

SINE – Short Interspersed Nuclear Elements (Къси разпръснати ядрени елементи)

UTRs – Untranslated Regions (Нетранслирани райони)

I. Въведение

Пиперът е втората по стопанско значение зеленчукова култура за България, която се характеризира с голямо морфологично разнообразие, но поради дългогодишна селекция е със стеснена генетична база. Индуцирането и характеризирането на мутации, засягащи ценни стопански признаци, който наред с класическите методи е рационален подход в селекционното подобряване на културния вид. Идентифицирането на мутации, водещи до по-високи концентрации на вещества с антиоксидантни свойства, като бета-каротен, е изключително важно за повишаване на биологичната стойност на плодовете. Повишаването на хранителното качество е от голямо значение за бъдещото развитие на селекцията на пипера.

Ефективността на мутационната селекция се увеличава с прилагането на молекулярни техники за оценка на генетичния потенциал на колекцията от пипер. Прилагането на подходящи ДНК маркери намалява нуждата от фенотипни анализи, повлиявани от факторите на околната среда. Установяването на специфични полиморфни профили и генотипирането на образци от пипер, които да бъдат прилагани в ранен етап от развитието на растенията позволява ускоряване на селекционния процес.

През последните десетилетия са разработени множество системи за идентифициране на молекулярни маркери, основаващи се на различни подходи, включително такива, които се установяват чрез PCR реакция. В настоящия дисертационен труд в колекция образци от пипер са използвани амплификации на ДНК последователности чрез ISAP метод между два ретроелемента от еднакви или различни SolS-SINEs фамилии. Ретроелементите представляват подвижни генетични елементи, присъстващи в голям брой копия в еукариотните геноми. Те са в основата на варирането на генома и имат отношение към еволюцията на видовете, поради което могат да бъдат използвани за характеризирането на генетичния им потенциал на всички систематични нива. Освен това, индуцираният мутагенезис води до активиране на подвижните генетични елементи при растенията, което ги превръща в подходящ инструмент за изследване на новогенерираните мутантни форми.

Съвременната селекция е молекулярната селекция. Тя е сплав от достиженията на биохимията, физиологията, познанията за биологията на развитието и обусловеността на всички тези функции на организмите от генетиката, за чието обединяване в едно цяло важно място заема автоматизираният математически анализ - биоинформатиката.

В това отношение темата на дисертационния труд е пряко свързана с решаването на изложените проблеми и показва значението на молекулярните методи и подходи за ускоряване на селекционния процес.

Мутагенезисът има потенциал да индуцира мутации, като активира подвижните елементи. ДНК последователността на гена би могла да включва подвижен елемент, в частност - SINE елемент(и). С това свойство те са подходящ инструмент за изследване на индуцирани мутанти. Много SINE семейства са били активни в рамките на общия прародител на два растителни вида. Затова те, избрани от генома на картофите, успешно могат да бъдат използвани за молекулярно изследване, включително за генотипиране на пипера.

Мутациите в гени, свързани с каротеноидния биосинтетичен път, като фитоеен синтаза (*Psy*), капсантин-капсорубин синтаза (*Ccs*) и бета-каротен хидроксилаза (*CrtZ*), обикновено водят до фенотипна промяна на цвета на плодовете в ботаническа зрялост от червени в оранжеви. Ензимът бета-каротен хидроксилаза е отговорен за превръщането на бета-каротена в бета-криптоксантин. Предварително установените по-високи нива на бета-каротен при мутантен сорт Оранжева капия, в сравнение с изходния, дават основание да се допусне, че поради настъпила мутация на бета-каротен хидроксилазния ген не може да се осъществи превръщането на оранжевия пигмент в жълт бета-криптоксантин и в резултат се акумулира в плодовете. Предварителни изследвания в колектива идентифицират мутацията в *CrtZ_{chr03}* гена, като причина за формиране на оранжеви плодове и разработват *CrtZ-C/C* молекулен маркер, основаващ се на ДНК полиморфизъм в β -каротен хидроксилазния ген между мутантен генотип Оранжева капия и изходен генотип Пазарджишка капия 794. Тези изследвания послужиха като отправна точка за детайлно характеризиране на вида на настъпилата мутация в сорт Оранжева капия.

II. Цел и задачи

Целта на настоящата работа включва подбор на молекулярно-генетични маркерни системи за оптимизиране и улесняване на селекционния процес при пипера, както и молекулярно-генетично характеризиране на мутантен сорт пипер с повишена концентрация на β -каротен.

За постигането на целта бяха поставени следните задачи:

1. Изследване степента на полиморфизъм на колекция пипер посредством ISAP маркерна система, основаваща се на секвенциите на високополиморфни SINE фамилии от биоинформатичните данни на близкородствения моделен вид картофи. Сравняване на резултатите при пипер с получените при български сортове картофи от вид *Solanum tuberosum* L.

2. Изследване на степента на полиморфизъм в групата на индуцираните мутанти пипер, показали изцяло мономорфен ISAP профил посредством RAPD анализ.
3. Амплифициране на бета-каротен хидроксилазните гени *CtrZ_{chr03}* и *CtrZ_{chr06}* и определяне нивата на транскрибирането им при изходен и мутантен генотип пипер.
4. Клониране, секвениране и сравнителен биоинформатичен анализ на двата *CrtZ* гена от мутантен и изходен генотип, както и от избран представител от българските сортове пипер (Куртовска капия 1).
5. Определяне типа на възникналата мутация в *CrtZ_{chr03}* ген чрез амплифициране на различни участъци извън целевия локус на трета хромозома при изходен генотип, мутантен генотип и сорт пипер Куртовска капия 1.

III. Материали и методи

Изследването е проведено върху 74 генотипа пипер, включващи местни и чуждестранни образци, както и линии и сорт, получени чрез индуцирана мутагенеза. За преценка на приложимостта на ISAP маркерите са използвани 8 представителя от поддържаните в ИЗК „Марица“ български сортове картофи *Solanum tuberosum* L. Растителните материали от образци пипер в изследваната колекция са любезно предоставени от проф. д-р Николай Панайотов и проф. д-р Нася Томлекова. Растителният материал от сортове картофи е любезно предоставен от доц. д-р Емилия Начева.

Използваните в настоящия дисертационен труд аналитични методи включват RAPD, ISAP, RT-PCR, ген-специфична амплификация, както и клониране и секвениране на ДНК фрагменти.

Биоинформатичната част включва работа с бази данни и използване на софтуер за анализ на профили и последователности.

IV. Резултати

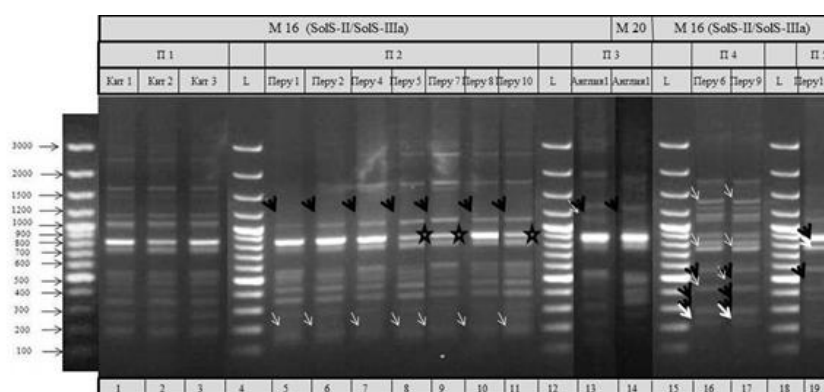
4.1 Оценка на приложимостта на SINE маркерите при пипера.

4.1.1 ISAP анализ на образци пипер

От проведените ISAP реакции при пипер с праймери базирани на високополиморфни SINE фамилии при картофи е установено, че при пипера с най-голям потенциал за изследване и генотипиране са праймери SolS-II-F/SolS-II-R и праймери SolS-V-F/SolS-V-R.

Еднофамилна реакция (проведена с прав и обратен праймер, конструирани от една SolS - SINE фамилия) с праймери SolS-II-R/SolS-II-F води до амплифициране на 18 фрагмента на матрицата и до формирането на 5 профила. Първия профил се амплифицира при общо 56 представителя (55 представителя от вид *S. annuum* и изследвания представител

от вид *C. fasciculatum*) (фиг. 1) с изключение на Англия 1. При първия профил се амплифицират 11 фрагмента от матрицата.(фиг. 1, стартове - 1, 2 и 3).



Фигура 1. Пет амплифицирани ISAP профили с реакция SolS-II-F/SolS-II-R

*Профили 1 (стартове 1, 2 и 3), профил 2 (стартове 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11), профил 3 (стартове 13, и 14), профил 4 (стартове 16 и 17) и профил 5 (старт 19)

**С черна стрелка са обозначени фрагментите които липсват, сравнени с профила на *C. annuum*, а допълнително амплифицираните фрагменти са показани с бяла стрелка.

***Петте профила са представителни за изследваните образци

С праймерна двойка SolS-II-R/SolS-II-F при представителите от група видове и подвидове от род *Capsicum*, различни от *C. annuum* – Перу 1, Перу 2, Перу 4, Перу 5, Перу 7, Перу 8 и Перу 10 (фигура 9, стартове 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11) се амплифицира втория профил. Този профил е сходен с профила на *C. annuum*, но при тях, за разлика от профил 1, липсва фрагмент с дължина на 1200 bp и има допълнително амплифициран фрагмент с дължина 150 bp.

При Англия 1 се амплифицира трети профил. За разлика от другите представители на *C. annuum*, при Англия 1 липсва фрагмент с дължина 1100 bp и има допълнителен амплифициран фрагмент с дължина 1070 bp при еднофамилна реакция SolS-II-F/SolS-II-R и при мултиплексни реакции (реакции включващи прав и обратен праймер от различни SolS-SINE фамилии): М 16 с праймерна комбинация SolS-II/SolS-IIIa и М 17 с праймерна комбинация SolS-II/SolS-IIIb (фиг. 1, старт 10). При проведената мултиплексна реакция М 20 с праймерна комбинация SolS-II/SolS-VI (фиг. 1, старт 14) при Англия 1 напълно липсват фрагменти с дължина 1100 bp и 1070 bp.

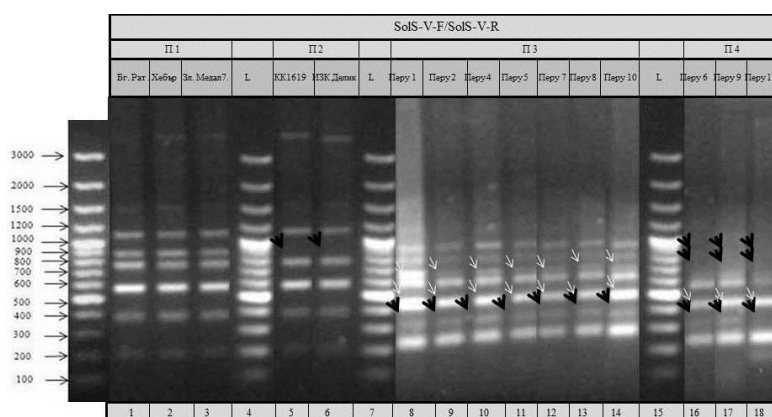
При всички 6 представители на вид *C. baccatum* се амплифицира четвъртия установен профил. При тях, за разлика от представителите на *C. annuum*, има допълнително амплифицирани фрагменти с дължини на 1300 bp и 700 bp. Фрагментът с дължина 450 bp не

е амплифициран, но има допълнително амплифициран фрагмент с дължина 400 bp. Липсва и амплификация на фрагменти с дължина 350 bp и 270 bp и има допълнително амплифициран фрагмент с дължина 250 bp (фиг. 1, стартове 16 и 17).

Проведената реакция при представителя на *C. pubescense* води до формиране на петият профил. При него, за разлика от профил 1 липсва амплификация на фрагменти с дължина 750 bp и 500 bp и има допълнително амплифициран фрагмент с дължина 730 bp (фиг. 1, старт 19).

Всеки от 5-те амплифицирани профила включва определен брой образци. Профили 1, 2 и 3 се амплифицират при представители от вид *C. annuum*, представител на вид *C. fasciculatum* и представителите на вид *C. frutescens*. Профил 4 се амплифицира при изследваните представители на вид *C. baccatum*. Изследваният представител на *C. pubescense* формира профил 5. Най-отдалечени са образците, амплифициращи профил 1 и образците амплифициращи профил 4.

Реакцията с праймери SolS-V-F/SolS-V-R води до формирането на 4 профила. Профил 1 се амплифицира при общо 55 представителя (54 представителя от вид *C. annuum* и представителят (1) на *C. fasciculatum*). Профил 1 е характерен и за изследвания представител от вид *C. fasciculatum* и всички изследвани представители от род *C. annuum* (фиг. 2, стартове от 1 до 3) с изключение на сортовете Куртовска капия 1619 и ИЗК Деликатес, които формират профил 2, тъй като при тях липсва амплификация на фрагмента с дължина на 900 bp (фиг. 2, стартове 5 и 6).



Фигура 2. Четири амплифицирани ISAP профила с реакция SolS-V-F/SolS-V-R

*Профили 1 (стартове 1, 2 и 3), профил 2 (стартове 5 и 6), профил 3 (стартове от 8 до 14) и профил 4 (стартове 16 и 18)

**С черна стрелка са обозначени фрагментите които липсват, сравнени с профила на *C. annuum*, а допълнително амплифицираните фрагменти са показани с бяла стрелка.

***Четири профила са представителни за изследваните образци

При седем представителя от група видове и подвидове от род *Capsicum* различни от *C. annuum*- представители от Перу (Перу 1, Перу 2, Перу 4, Перу 5, Перу 7, Перу 8 и Перу 10) се формира трети профил. Представителите от вид *C. baccatum* и представителят от вид *C. pubescense* амплифицират четвърти профил. (фиг. 2, стартове 16 до 18.

Всеки от 4-те амплифицирани профила включва различен брой изследвани образци пипер. Профил 1 и 2 се генерира при представители от вид *C. annuum* и представител на вид *C. fasciculatum*. Профил 3 се амплифицира при изследваните представители на вид *C. frutescens*. Изследваните представители на вид *C. baccatum* и представителят на вид *C. pubescense* амплифицират профил 4. Най-отдалечени са образците генериращи профил 1 и профил 4.

Таблица 1. Разпределение на амплифицираните полиморфни профили в шестте изследвани групи пипер

Групи с растителен материал	1. Видове и подвидове от род <i>Capsicum</i>	2. Образци с чуждестранен произход	3. Местни образци	4. Спонтанни мутанти	5. Индуцирани мутанти	6. Сортове
профили с SolS-II-F/R	1, 2, 4 и 5	1 и 3	1	1	1	1
профили с SolS-V-F/R	1, 3 и 4	1	1	1	1	1 и 2

Група видове и подвидове от род *Capsicum* различни от *C. annuum* включваща 17 изследвани образци се амплифицират 4 от общо 5 полиморфни профили (профил 1, профил 2, профил 4 и профил 5) при реакция с праймери SolS-II-F/R. В същата група при реакция с праймерна двойка SolS-V-F/R се генерират 3 от общо 4 полиморфни профили (профил 1, профил 3 и профил 4). В тази група е отчетено най-голямо ниво на полиморфизъм, а изследваните образци се групират в най-много полиморфни профили. Тази тенденция се установява и с двете ISAP реакции показали най-голям потенциал за изследване при пипер. В групата на образците с чуждестранен произход от вид *C. annuum* включваща 12 изследвани образци при реакция с праймери SolS-II-F/R се амплифицират 2 профила. От тях при 11 представителя се генерира профил 1, а профила на един от тях (Англия 1) е различен и не се групира с останалите профили. При реакцията с праймери SolS-V-F/R, обаче всички 12 изследвани образци амплифицират профил 1. В групите: Местни образци от вид *C.*

annuum, включващи 7 изследвани представителя, група спонтанни мутанти от вид *C. annuum*, включващи 11 изследвани образци и група изходни генотипи и индуцирани мутанти от вид *Capsicum annuum*, включваща 11 представителя и с двете реакции SolS-II-F/R и SolS-V-F/R се генерират профили 1. При групата на Български сортове пипер от вид *C. annuum*, включваща 15 изследвани образци при реакция с праймери SolS-V-F/R се амплифицират 2 профила. От тях 13 представителя генерират профил 1, а 2 представителя - профил 2. При реакцията с праймери SolS-II-F/R, обаче всички 15 изследвани образци амплифицират 1-профил 1 (табл. 1).

Горе изложените факти сочат, че в група видове и подвидове от род *Capsicum* различни от *C. annuum* има най-много образци с амплифицирани полиморфни профили. От тук следва, че SINE базираните ISAP реакции с праймери конструирани от генома на картофите са най-подходящи за идентифициране на различните видове от род *Capsicum*, но ефективността им по отношение на вътревидова идентификация е ниска. В изследваната колекция най-много (56) са представителите от вид *C. annuum*. Сред тях с две реакции могат да се идентифицират общо три представителя, генериращи два различни профила: Англия 1 с реакция SolS-II-F/SolS-II-R (фигура 1, стартове 13 и 14), а Куртовска капия 1619 (фигура 2, старт 5 и 6) и ИЗК Деликатес (фигура 2, старт 6) с реакция SolS-V-F/SolS-V-R, като тези два сорта са с еднакъв профил.

Таблица 2. Резултати, брой амплифицирани профили, полиморфни и мономорфни фрагменти, амплифицирани с еднофамилните ISAP реакции SolS-II-F/R и SolS-V-F/R при пипер

Праймери	Брой изследвани образци	Брой полиморфни профили	Брой фрагменти с различни дължини на матрицата	Дължини на възпроизводителите фрагменти от/до (bp),	Брой мономорфни фрагменти	Брой полиморфни фрагменти
SolS-II-F/R	73	5	18	2000/150	4	14
SolS-V-F/R	73	4	7	1000/200	2	5

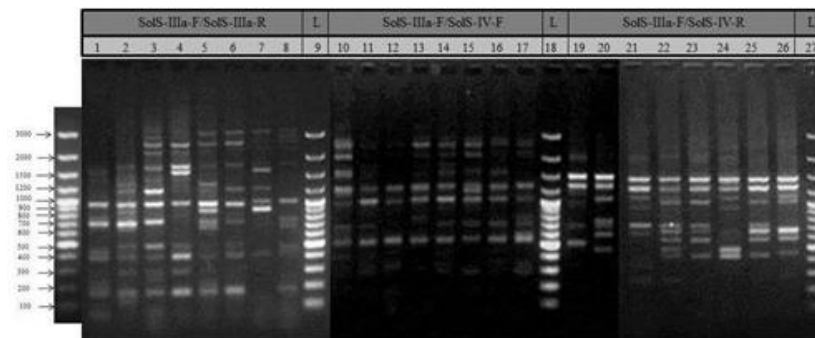
Реакциите с праймерна двойка SolS-V-F/R може да бъде използвана за разграничаване на образци от вид *C. annuum* от образците от вид *C. baccatum*, но с тази праймерна двойка при представителите от вид *C. baccatum* и представителя от вид *C. pubescens* се амплифицира мономорфен профил. За разлика от праймерите от SolS-V фамилията, с праймерна двойка SolS-II-F/R могат да бъдат разграничени представителите от трите вида *C. annuum*, *C. baccatum* и *C. pubescense* (табл. 2).

Според данните от проведените в дисертацията експерименти най-ясно е очертана разликата в профилите на представителите на вид *C. baccatum* от останалите изследвани образци. Съществени разлики в профилите на вид *C. baccatum* са отчетени и с двете праймерни двойки SolS-II-F/R и SolS-V-F/R, дали най-добър резултат при пипера. Профил 1 се амплифицира при почти всички представители на вид *C. annuum*, с изключение на Англия 1, а профил 4 – при представителите на вид *C. baccatum*. Предвид факта, че най-голяма е разлика е отчетена между профил 1 и профил 4 с праймери SolS-II-F/R можем да заключим, че най-отдалечени са профилите на вид *C. annuum* и вид *C. baccatum*. Тази тенденция се установява и с втората праймерна двойка, дала полиморфни профили SolS-V-F/R. Най-голяма е разликата между профил 1, който е амплифициран при почти всички представители на вид *C. annuum*, с изключение на два от изследваните сорта, амплифициращи профил 2, който се различава само по един полиморфен фрагмент от профил 1. Най-отдалечен от профил 1 е профил 4, който е генериран при всички представители на вид *C. baccatum* и представителя на *C. pubescense*. Наличието на такава разлики между изследваните представители от двата вида означава, че съществува причина за групиране на образците, която можем да приемем, че е генетично обусловена. Друг интересен факт е, че изследваният представител на *C. pubescense*, при които се амплифицира профил 5 е сходен с профилите амплифицирани при представителите от вид *C. baccatum*, а с реакцията проведена с праймерна двойка SolS-V-F/R (фиг. 2) амплифицират един и същи профил 4.

4.1.2. ISAP анализ на български сортове картофи

За валидиране на резултатите, получени при пипера, са проведени SINE-базирани ISAP реакции с осем български сорта картофи: Иверце, Орфей, Надежда, Перун, Павелско, Рожен, Калина и Бор. В изследването са включени 9 праймерни двойки (общо 18 праймера).

Анийлинг температура T_a 52°C е използвана при прилагането на ISAP техниката при пипер. Тъй като праймерите са конструирани от генома на картофите, при изследване на българските сортовете картофи температурата на анийлинг е увеличена на 58°C, за да бъде увеличена специфичността на амплифицираните профили.



Фигура 3. Резултат от амплифицираните профили при 8 български сорта картофи с анийлинг температури с Та 52°С

*С праймери SolS-IIIa-F/R (стартове от 1 до 8), с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-F (стартове от 10 до 17) и с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-R (стартове от 19 до 26). Стартове 1, 10 и 19 - сорт Иверце; 2, 11 и 20 - сорт Орфей; 3, 12 и 21 - сорт Надежда; 4, 13 и 22 - сорт Перун; 5, 14 и 23 - сорт Павелско; 6, 15 и 24 - сорт Рожен; 7, 16 и 25 - сорт Калина; 8, 17 и 26 - сорт Бор; 9, 18 и 27 – Ladder

При провеждане на реакцията с по-висока Та 58°С има само 2 допълнително амплифицирани фрагмента, а не се амплифицират и съответно не се визуализират общо 14 от амплифицираните фрагменти с Та 52°С. Следователно Та 52°С е подходяща за изследване, както на картофите, така и при пипера.

Таблица 3. Профили на осем български сорта картофи, амплифицирани чрез ISAP реакции с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, SolS-IIIa-F/SolS-IV-F и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R с избраната Та 52°С

Праймери	Изслени образци	Брой полиморфни профили	Брой фрагменти на матрицата	Дължини на възпроизводимите фрагменти от/до (bp)	Брой моно морфни фрагменти	Брой поли морфни фрагменти
SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R	8	6	13	2000/200	3	10
SolS-IIIa-F/SolS-IV-F	8	5	10	3000/500	4	6
SolS-IIIa-F/SolS-IV-R	8	6	15	2000/200	2	13

Трите ISAP реакции с праймерни двойки SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, SolS-IIIa-F/SolS-IV-F и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, водещи до амплифициране на най-много полиморфни фрагменти при картофите, генерират общо 38 фрагмента, от които 9 мономорфни и 29 полиморфни (табл. 3).

Таблица 4. Профили на български сортове картофи, генерирани с ISAP реакции с праймери, водещи до амплифициране на най-много полиморфни профили, установени с Ta 52°C

Праймерни и двойки	ISAP профили							
	Иверце	Орфей	Надежда	Перун	Павелско	Рожен	Калина	Бор
SolS-IIIa-F/ SolS-IIIa-R	1	2	3	4	2	3	5	6
SolS-IIIa-F/ SolS-IV-F	1	1	2	3	1	4	1	5
SolS-IIIa-F/ SolS-IV-R	1	2	3	4	2	5	2	6

Различни номера съответстват на различния брой генерирани профили

Шест профила са амплифицирани с праймери SolS-IIIa-F/R и дават възможност за идентифициране на сортове Иверце, Перун, Калина и Бор (фиг. 3, стартове 1, 4, 7 и 8). Профилите на сортове Орфей и Павелско са идентични, но различни от останалите генерирани профили с Ta 52°C (фиг. 3, стартове 2 и 5). С Ta 58°C двата генотипа Орфей и Павелско се различават по три фрагмента. Профилите на сортове Надежда и Рожен с праймери SolS-IIIa-F/R също са идентични (фиг. 3, стартове 3 и 6), но могат да бъдат различени с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-R (фиг. 3, стартове 21 и 24).

Профилите, генерирани с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-F, дават възможност за идентифициране на сортове Надежда, Перун, Рожен и Бор (фиг. 3, стартове 12, 13, 15 и 17), докато при сортове Иверце, Орфей, Павелско и Калина амплифицираните профили са мономорфни (фиг. 3, стартове 10, 11, 14 и 16). Сортовете Иверце, Надежда, Перун, Рожен и Бор (фиг. 3, стартове 19, 21, 22, 24 и 26) могат да бъдат идентифицирани с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, а профилите амплифицирани при Орфей, Павелско и Калина са мономорфни (фиг. 3, стартове 20, 23 и 25).

В настоящата дисертация за първи път чрез SINE базирани ISAP реакции са изследвани най-важните за българското производство сортове картофи. Чрез проведеното

генотипиране са установените молекулни профили на сортовете Иверце, Надежда, Орфей, Перун, Павелско, Рожен, Калина и Бор. Установените две праймерни комбинации SolS-IIIa-F/R и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R водят до идентифициране на всички изследвани сортовете картофи, поради което са избрани като най-подходящи за идентификация на българските сортове картофи (табл. 4).

Две праймерни комбинации SolS-IIIa-F/SolS-IV-R и SolS-IIIa-F/R дават възможност за идентифициране на всичките 8 български сорта картофи. Най-много полиморфни профили (7) са амплифицирани с праймерна комбинация SolS-IIIa-F/R, а най-много фрагменти на матрицата и най-много полиморфни фрагменти са амплифицирани с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-R (табл.3).

За разлика от резултатите на германския екип при българските сортове най-много полиморфни профили са амплифицирани с праймерна комбинация SolS-IIIa-F/R чрез използване на две различни температури на хибридизация. Независимо че оптимизираните условия за амплификация се различават от първоначалните условия на германските колеги, получените в настоящето изследване данни са съпоставими с техните резултати (Seibt et al. 2012):

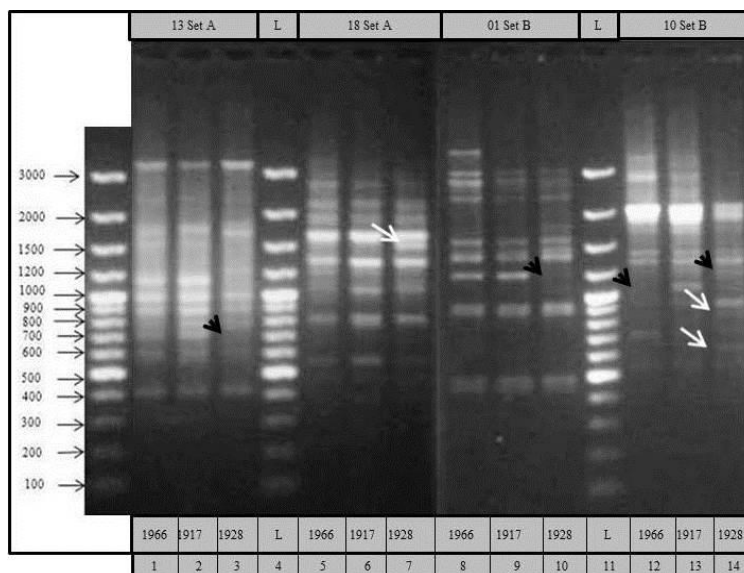
1) реакциите с праймерни двойки SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, SolS-IIIa-F/SolS-IV-F и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R водят до амплифицирането на най-много полиморфни фрагменти, и 2) най-специфични са профилите, амплифицирани с праймерна комбинация SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, независимо от факта, че германският екип е използвал разширени с GC праймерни секвенции и съответно по-висока температура на анилинг. При българските сортове картофи, най-голям брой полиморфни фрагменти са амплифицирани с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, но най-голям брой полиморфни профили са амплифицирани с праймерна двойка SolS-IIIa-F/R. Реакцията с праймерна двойка SolS-IIIa-F/R дава възможност за идентифициране на 6 от 8 изследвани сорта картофи. Най-ниско ниво на полиморфизъм при българските сортове е отчетен с праймери SolS-IIIa-F/SolS-IV-F.

4.2. RAPD анализи

При обработване на резултатите от ISAP реакциите с различните праймерни комбинации в различните групи изследвани образци е установено, че в групата индуцирани мутанти амплифицираните профили са мономорфни. За установяване на полиморфизъм в тази група е приложена допълнително друга молекулно-маркерна техника-RAPD.

RAPD анализите са проведени с общо 40 праймера. Като най-информативни са избрани 16 праймера, генериращи най-ясни и много на брой фрагменти. Дванадесет от избраните праймери водят до амплифициране на мономорфни профили при всички изследвани образци.

Четири праймери генерират полиморфни профили в някои от анализираниите линии и сортове. Три от реакциите с праймери (A13, A18 и B01) водят до амплифициране на полиморфни фрагменти в генотип Златен медал *ms8* (фиг. 4, стартове 3, 7 и 10), докато праймер B10 води до амплифициране на полиморфни фрагменти при генотип Златен медал *ms8* (фиг. 4, старт 14) и Пазарджишка капия 794 (фиг. 4, старт 12).



Фигура 4. Полиморфни профили, амплифицирани при три генотипа пипер (сорт Пазарджишка капия 794, сорт Оранжева капия и Златен медал *ms8* (1928))

*Стартове от 1 до 3 са проведени с праймер 13 от набор А, стартове от 5 до 7 са проведени с праймер 18 от набор А, стартове от 8 до 10 са проведени с праймер 01 от набор В, стартове от 12 до 14 са проведени с праймер 10 от набор В

**Сорт Пазарджишка капия 794 - стартове 1, 5, 8 и 12, сорт Оранжева капия - стартове 2, 6, 9 и 13, Златен медал *ms8* (1928) - стартове 3, 7, 10 и 14

***Белите стрелки показват полиморфните допълнително амплифицирани фрагменти, а черните стрелки показват полиморфните фрагменти, които липсват

Не е отчетен полиморфизъм при сорт Албена, линии 1933^(of. al) и 1935^(of. al) с използваните в това изследване RAPD праймери.

Реакциите с праймери A13, A18, B01 и B10 водят до амплифициране на 6 полиморфни фрагменти от общо 49 амплифицирани, а дължините на възпроизводимите фрагменти при четирите реакции е от 300 bp до 2900 bp. (табл. 5). В настоящата работа е изследвана група от изходни и мутантни образци, което определя и тяхното генетично сходство. Независимо, че общият процент на полиморфизъм е само 12,2% спрямо четирите праймера, водещи до амплификация на полиморфни фрагменти и под 1% спрямо всички изследвани праймери

(табл. 5), все пак тази техника дава възможност за идентифициране на 2 генотипа от изследваната група.

Таблица 5. Праймери и параметри на амплифицирани фрагменти при полиморфни RAPD реакции при група изходни и мутантни генотипи пипер

Праймери	Брой изследвани образци	Поли морфни образци	% поли морфни образци	Брой фрагменти с различни дължини на матрицата	Дължини на възпроизводимите фрагменти от/до (bp),	Поли морфни фрагменти	% поли морфни фрагменти
A13	7	1	14,29	10	300-1900	1	10
A18	7	1	14,29	13	400-2800	1	7,69
B01	7	1	14,29	12	410-3000	1	8,33
B10	7	2	28,57	14	550-2900	3	21,43

Изследването демонстрира приложимостта на RAPD като полезен и достъпен инструмент в молекулярната селекция на пипер. Въпреки няколко известни недостатъка на този метод, той дава възможност за бърза и евтина амплификация на полиморфни фрагменти (Williams et al., 1990) и диференцирането на дори тясно свързани генотипи в изследваните колекции (Welsh and McClelland, 1990).

Към изследваната група изходни генотипи и индуцирани мутанти от вид *C. annuum* се включват изходен генотип Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия, характеризиращ се със завишени нива на бета-каротен и оранжев цвят на плодовете. Приложените ISAP и RAPD маркерни техники не позволяват идентифицирането и молекулярното характеризиране на настъпилата мутация, което налага използването на друг молекулярен подход, който включва ген-специфични PCR анализи, клониране и секвениране на мутантните гени, проведени съгласно първоначалната хипотеза.

4.3. Характеризиране на мутация, водеща до оранжево оцветяване на плодовете и завишени нива на бета-каротен в мутантен сорт Оранжева капия

PCR анализи на секвенцията на ген *CrtZ*_{chr03} при изходен и мутантен сорт пипер

Секвенцията на гена β -каротен хидроксилаза (*CrtZ*_{chr03}) локализиран на трета хромозома се състои от 7 екзона и 6 интрона. Старт кодона на депозираните в NCBI базата данни секвенции започва от 17 нуклеотид, а стоп кодона започва на 2039 нуклеотид.

Извършени са 36 конвенционални PCR реакции при изходен сорт Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия с праймери локализиращи на различни позиции в секвенцията.

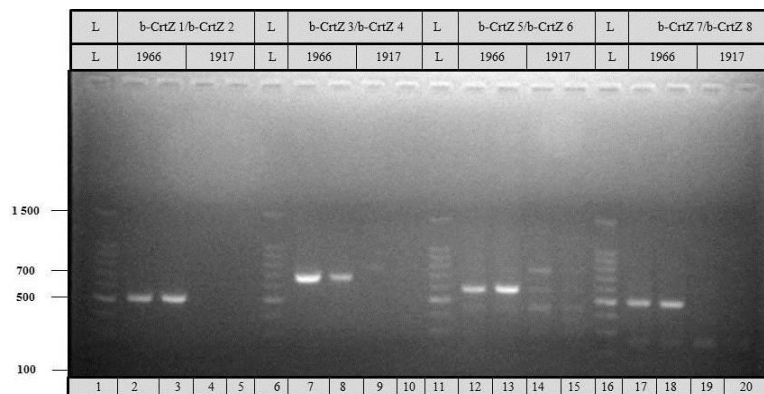
Първоначално са проведени четири PCR реакции с два представителя на изходен генотип Пазарджишка капия 794 и два представителя на мутантен генотип Оранжева капия с праймери, конструирани по интронните участъци на секвенцията, така че позволяват амплифициране на цялата секвенция на ген *CrtZ_{chr03}* на четири припокриващи се участъка (фиг. 5, табл. 6).

Таблица 6. Резултати от PCR реакциите с праймери, локализиращи в интронните области на ген бета-каротен хидроксилаза 2 (*CrtZ_{chr03}*) при изходен генотип пипер Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия

Праймери	Амплифициран регион по екзонни и интронни области на гена	Позиция на праймерите в кДНК на гена	Позиция на праймерите в геномната секвенция на гена	Очаквана дължина на фрагментите в bp.	Получени резултати	
					изходен	мутантен
b-CRT 1/ b-CRT2	E'1+И'1	9/448	1/514	514	514	(-)
b-CRT 3/ b-CRT4	И'1+E2+И2+E3+И3+E'4	449/601	483/1155	673	673	790
b-CRT 5/ b-CRT6	И'3+E4+И4+E5+И'5	572/838	1127/1710	584	584	750 580 450 300
b-CRT 7/ b-CRT8	И'5+E6+И6+ E'7	839/1020	1602/2088	487	487	(-)

*И-интрон, И[']- само участък от съответния интрон, E-екзон, E[']- само участък от съответния екзон

При мутанта две от четирите реакции позволиха амплифициране на фрагменти с различна от очакваната дължина, която е различна от тази на изходния генотип (фиг. 5, табл. 6).

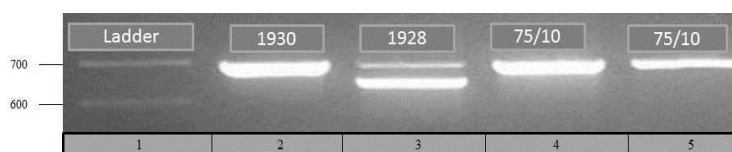


Фигура 5. Амплифицирани фрагменти с праймери b-CrtZ 1/b-CrtZ 2, b-CrtZ 3/b-CrtZ 4, b-CrtZ 5/ b-CrtZ 6, b-CrtZ 7/b-CrtZ 8 при два представителя на изходен генотип Пазарджишка капия 794 и два представителя на мутантен генотип Оранжева капия

За установяване на конкретния регион на локализация на мутацията е извършено прегрупиране на всички 18 налични праймери чрез биоинформатичен анализ. Успешно конструирани са 24 PCR реакции.

Отчетена е амплификацията на девет фрагмента при мутанта. Амплифицираният регион обхваща област от интрон 1 до екзон 7, включващ и стоп-кодонът на гена, но са получени резултати с очаквана дължина (предваритено биоинформатично изчислена) на фрагментите само при изходния генотип Пазарджишка капич 794. Амплифицираните фрагменти при мутантата са неспецифични, което е потвърдено и в по-късен етап от изследванията чрез секвениране.

Чрез праймерна двойка (CrtZ-C_F/CrtZ-C_R) конструирана така, че да амплифицира фрагменти и от двата бета-каротен хидроксилазни гена при пипера (*CrtZ*_{chr03} и *CrtZ*_{chr06}, локализирани на 3-та и 6-та хромозома) се установяват растения със завишена концентрация на β -каротен.



Фигура 6. PCR фрагменти, амплифицирани с праймерна двойка CrtZ-C/C

*Старт 1 - Ladder; старт 2 - 1930 (*of. al. ms8*) (оранжев цвят на плодовете); старт 3 - контрола Златен медал *ms8* (1928) (червен цвят на плодовете); стартове 4 и 5 - два представителя на генотип 75/10 (оранжев цвят на плодовете)

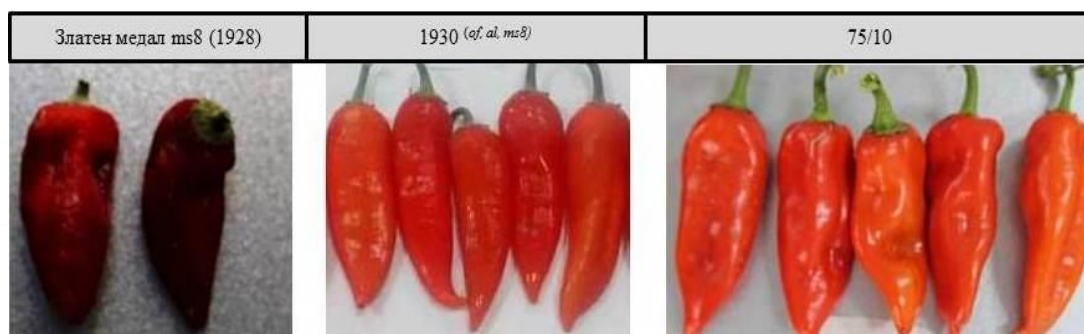
Използването на молекулен маркер за високи β -каротенови концентрации с *CrtZ-C/C* праймерната комбинация показва ясно разграничим полиморфизъм (фиг.6).

При ДНК от растения с червени плодове (контрола) се амплифицират два фрагмента от двете известни при пипера β -каротен хидроксилази (фиг. 6, старт 3). Единият е с дължина 622 bp, съответстваща на очакваната публикувана пълна секвенция на *CrtZ_{chr03}* гена в генбанката на NCBI (образци: GU122940; GU122941; GU122942; GU122943; GU122944; GU122945; GU122946) (табл. 7). Вторият фрагмент е с дължина 737 bp, (фиг. 6). При ДНК проби от мутантни растения с оранжев цвят на плодовете и високи концентрации на β -каротен в тях, се наблюдава само един фрагмент с дължина 737 bp амплифициран от ген *CrtZ_{chr06}* (фиг. 6, стартове 2, 4 и 6) (табл. 7).

Таблица 7. Резултат от PCR за установяване на растения със завишена концентрация на β -каротен

Праймери	Очаквана дължина на фрагмента в bp	Дължина на фрагментите		
		1930 ^(of,al,ms8)	75/10 мутант оранжев плод	Златен медал <i>ms8</i> контрола червен плод
<i>CrtZ-C_F</i> / <i>CrtZ-C_R</i>	737 622	737	737	737 622

Резултатите от проведените молекулярни анализи са потвърдени фенотипно във фаза масово плодоваване (фиг. 7). Получените резултати доказват приложимостта на маркера *CrtZ-C/C* в селекционната програма за разграничаване на изходни растения с червени плодове и мутантни растения с *bc* мутация. С *CrtZ-C/C* молекулярния маркер могат да бъдат установени и отбрани растенията с оранжев цвят на плодовете и високи концентрации на β -каротен в тях.



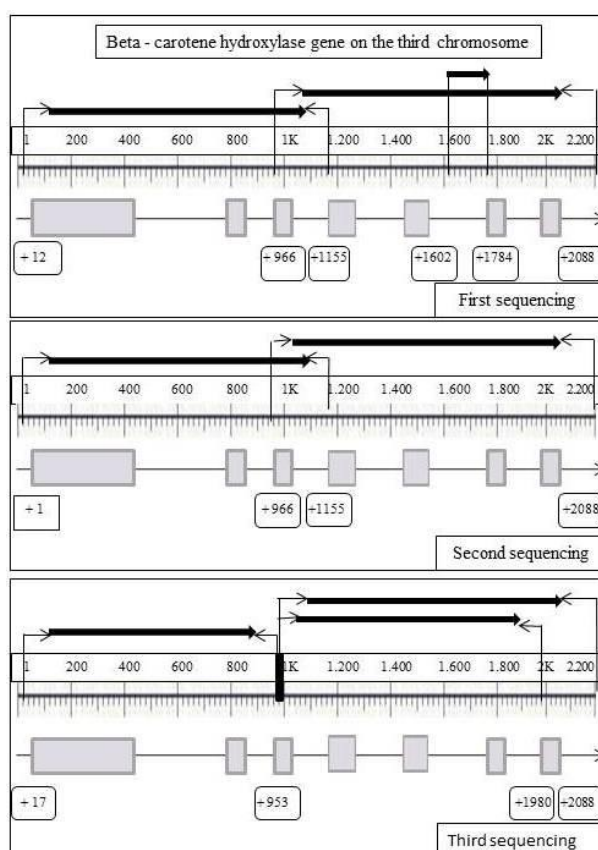
Фигура 7. Фенотипна характеристика на Златен медал *ms8*, 1930^(of,al,ms8) и 75/10

От проведените експерименти е установено, че молекулният маркер *CrtZ-C/C* е приложим за целите на селекционните програми при пипер.

4.3.2. Клониране и секвениране на бета-каротен хидроксилазните гени при изходен сорт Пазарджишка капия 794, мутантен сорт Оранжева капия и сорт Куртовска капия 1

Проведени са три серии на клониране, секвениране и последващ биоинформатичен анализ при три изследвани генотипа изходен генотип Пазарджишка капия 794, мутантен генотип Оранжева капия и избран български сорт Куртовска капия 1.

Праймерите, конструирани за извършване на трите серии на секвениране, обхващат цялата секвенция на гена с припокриващи се участъци (фиг. 8).

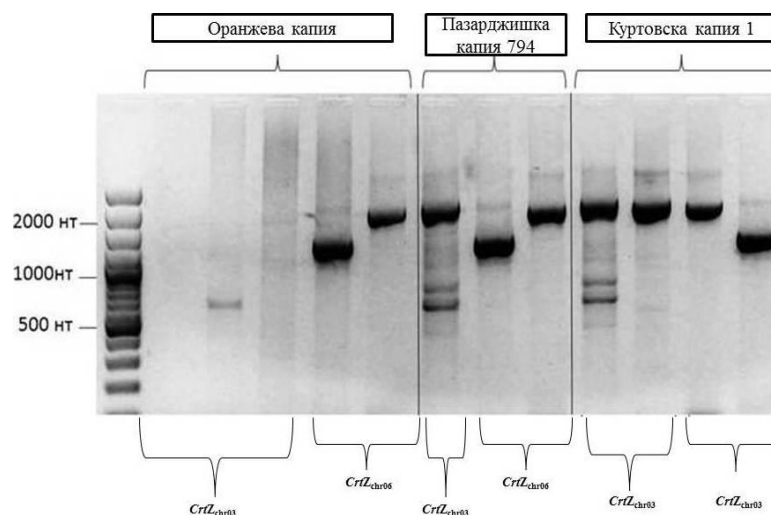


Фигура 8. Локализация на секвенираните фрагменти в ген *CrtZ*_{chr03} при трите серии на клониране и секвениране

Секвенираните клонове при мутанта са анализирани чрез BLAST анализ с NCBI базата данни. Тъй като не е открито сходство е направен анализ на базата с данни за лютия пипер, достъпна със сървъра на генома на пипера <http://peppersequence.genomics.cn/page/species/index.jsp>. Установено е, че секвенираните

клонове са участъци на случайни секвенции, която не са част от целевия ген, а секвенциите на различните клонове обхващат региони от различни хромозоми на пипера.

При последната серия на секвениране са включени и ново конструирани праймери, които са по-дълги и са конструирани така, че да избягват UTR регионите. Секвенирането е извършено с три генотипа сорт Куртовска капия 1, изходен генотип Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия (фиг. 9).



Фигура 9. Резултатите от амплификацията на клонове с праймери преди третото секвениране, визуализирани на електрофорезата

След обединяване на секвенциите поотделно на генотип Пазарджишка капия 794 и Куртовска капия 1 е установена идентичност на секвенцията с депозираните пълни секвенции на ген *CrtZ_{chr03}* в NCBI((образци: от GU122940; GU122941; GU122942; GU122943; GU122944; GU122945; GU122946).

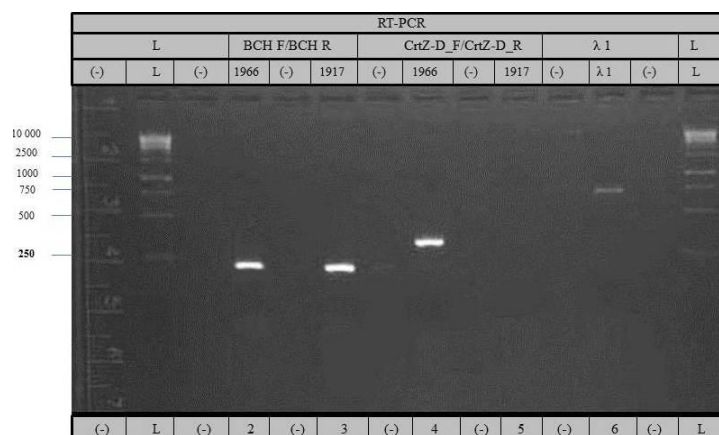
Извършено е клониране във вектор TZ57R и последващи секвениране на ген бета - каротен хидроксилаза, локализиран на 6-та хромозома *CrtZ_{chr06}* при три генотипа - Оранжева капия (мутантен), Пазарджишка капия 794 (изходен) и сорт Куртовска капия 1.

Анализите на обединените секвенции на ген *CrtZ_{chr06}* при трите секвенирани генотипа са идентични с представената обединена секвенция.

Получените и обработени резултати след секвенирането на *CrtZ_{chr06}* гена показват, че няма промяна в секвенцията му при мутантния генотип.

4.3.3. RT-PCR анализи за експресиране на бета-каротен хидроксилазните гени *CrtZ_{chr03}* и *CrtZ_{chr06}* при изходен и мутантен сорт пипер

За потвърждаване на резултатите, получени при мутантен генотип Оранжева капия, е извършен RT-PCR анализ на експресията с РНК от изходен генотип Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия с праймери, локализирани в секвенциите на гени *CrtZ_{chr03}* и *CrtZ_{chr06}*.



Фигура 10. Резултат от електрофореза след RT-PCR с праймери локализирани в секвенциите на ген *CrtZ_{chr06}* (старт 2 и 3) и ген *CrtZ_{chr03}* (старт 4 и 5) при изходен генотип Пазарджишка капия 794 (стартове 2 и 4) и мутантен генотип Оранжева капия (стартове 3 и 5)

*Старт 6 е проведен с праймери за елонгационен фактор 1 използван за контрола на реакцията

От получените резултати е отчетена амплификация на фрагменти с очаквана дължина при двата генотипа с праймери, позиционирани в ген *CrtZ_{chr06}* локализирани на 6-та хромозома при пипера (фиг. 10, стартове 2 и 3).

Таблица 8. Резултати от RT-PCR анализ на гени *CrtZ_{chr03}* и *CrtZ_{chr06}*

Амплифициран ген	Използвани праймери	Асс.№ кДНК	Локализация на праймерите по кДНК	Очаквана дължина на фрагмента	Резултати	
					изходен генотип	мутантен генотип
1. <i>CrtZ_{chr06}</i>	BCH F/ BCH R	Y09722	380/597	218	218	218
2. <i>CrtZ_{chr03}</i>	CrtZ-D F/ CrtZ-D-R	Y09225	526/866	341	341	(-)

При реакцията с праймери, позиционирани в ген *CrtZ_{chr03}*, локализиран на 3-та хромозома при пипера, фрагмент с очакваната дължина е амплифициран само при изходния генотип Пазарджишка капия 794 (фиг. 10, старт 4). При мутантен генотип Оранжева капия липсва амплификация на фрагмента (фиг. 10, старт 5) (таблица 8).

Получените резултати потвърждават, че в мутантия генотип Оранжева капия има транскрипт на ген бета-каротен хидроксилаза *CrtZ_{chr06}* и че този ген функционира нормално, но липсва транскрипт на ген бета-каротен хидроксилаза *CrtZ_{chr03}*, разположен на 3-та хромозома при мутантния генотип (фиг. 10 и табл. 8.).

Резултатите от транскрипционния анализ потвърждават резултатите от секвенционния анализ при мутантен и изходен генотип. Липсата на транскрипт при мутанта потвърждава, че функцията на ген *CrtZ_{chr03}* е блокирана, а нормално функциониращият *CrtZ_{chr06}* ген не може да компенсира функцията на ген *CrtZ_{chr03}*.

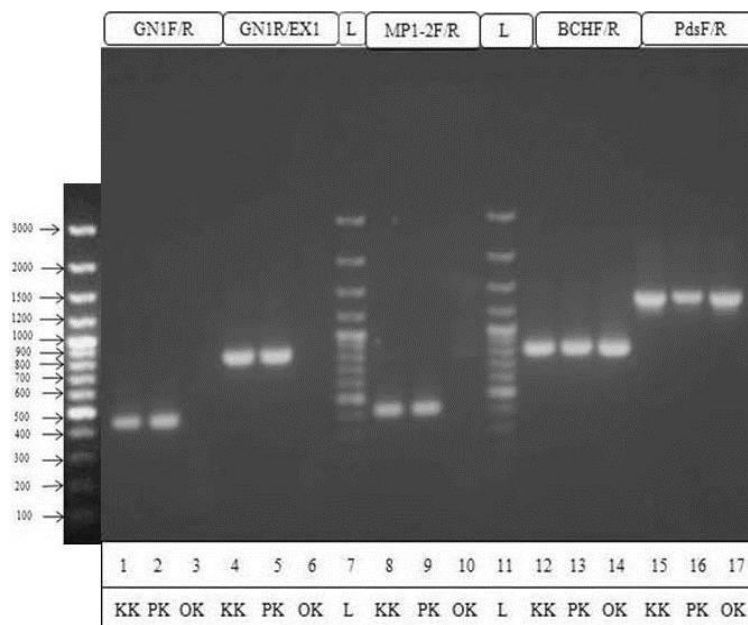
4.3.4. PCR анализи на фрагменти от хромозома 3 извън секвенцията на ген *CrtZ_{chr03}*

За установяване на типа на мутацията, и за да се установи дали тя засяга само конкретния ген или по-голям участък от хромозомата, са конструирани праймери, локализирани на различни разстояния от целевия ген в региони от междугенното пространство с известна последователност.

Таблица 9. Резултати от PCR анализите с праймери, граничещи с *CrtZ_{chr03}* гена и праймери, позиционирани в ген *CrtZ_{chr06}* и *Pds*

Праймери	Дистанция от целевия ген	Очаквана дължина на фрагмента в bp	Резултат	
			Изходен генотип	Мутантен генотип
GN 1 F/ GN 1 R	400 bp от старт кодона	415	415	(-)
GN1 R/ CrtZ R EX1	от края на екзон 1 и 415 нуклеотида от старт кодона	834	834	(-)
MP 1-2 F/ MP 1-2 R	26 744 bp от стоп кодона	412	412	(-)
BCH F/ BCH R	локализиран на 6-та хромозома	808	808	808
Pds F/ Pds R	49 396 300 bp от целевия ген	1310	1310	1310

В проведеня анализ е извършена амплификация при български сорт Куртовска капия 1, Пазарджишка капия 794 и мутантен генотип Оранжева капия с праймери, локализирани в секвенцията на фитоен синтазния ген (като контрола), който също е локализиран на хромозома 3, както и с праймери, позиционирани в ген *CrtZ*_{chr06}, локализиран на 6-та хромозома (като контрола).



Фигура 11. PCR фрагменти, амплифицирани с праймери, граничещи *CrtZ*_{chr03} гена и праймери, позиционирани в ген *CrtZ*_{chr06} и *Pds*

*Стартове 1, 4, 8, 12 и 15 - Куртовска капия 1, стартове 2, 5, 9, 13 и 16 - Пазарджишка капия 794, стартове 3, 6, 10, 14 и 17 - Оранжева капия, стартове 7 и 11 - DNA Ladder

В резултат на извършения PCR анализ на регионите преди и след секвенцията на ген *CrtZ*_{chr03} на хромозома 3 е установена амплификация на фрагменти с очакваната дължина при трите анализирани локуси с (1) промоторна област на целевия ген (415 bp), (2) до старт-кодона на първия екзон (834 bp), както и (3) 26 744 bp след гена (412 bp) само при генотип Куртовска капия 1 и изходен генотип Пазарджишка капия 794 (фиг. 11, стартове 1, 2, 4, 5, 8 и 9). При мутантния генотип са отчетени неспецифични фрагменти и липсва амплификация на фрагменти с очаквана дължина (фиг. 11, стартове 3, 6 и 10).

Допълнителен контрол на амплификацията е извършен с праймери, позиционирани в секвенциите на бета-каротен хидроксилазния ген, локализиран на 6-та хромозома и *Pds* гена. *Pds* гена при пипера е локализиран също на 3-та хромозома с разстояние до целевия ген 49 396 300 bp (Thorup et al., 2000). Установена е амплификация на фрагменти с очаквана

дължина и при трите изследвани генотипа. При трите генотипа са амплифицирани фрагменти с дължина 808 bp за *CrtZ_{chr06}* (фиг. 11, стартове 12, 13 и 14) и 1310 bp за *Pds* ген (фиг. 11, стартове 15, 16 и 17) (табл. 9).

При пипера са установени два гена за β -каротен хидроксилаза – *CrtZ_{chr03}* и *CrtZ_{chr06}* (Bouvier et al., 1998). Ген *CrtZ_{chr03}* е локализиран на трета хромозома 3, а ген *CrtZ_{chr06}* на шеста хромозома (Thorup et al., 2000).

Чрез конвенционални PCR реакции с праймери, локализирани в цялата секвенция на гена, серия от клонирания и последващи секвенирания, RT-PCR и конвенционални PCR реакции с праймери, позиционирани на различни разстояния от целевия ген, е установено, че липсва секвенцията на ген *CrtZ_{chr03}* в мутантния генотип. Липсата на *CrtZ_{chr03}* гена на 3-та хромозома води до нарушение в каротеноидния биосинтетичен път и в резултат до натрупване на високи нива на β -каротен при мутанта.

Създадената база данни позволи да се анализират обединените секвенции на *CrtZ_{chr06}* гена при трите изследвани генотипа. В настоящето проучване е доказано, че няма промяна в нуклеотидната последователност на ген *CrtZ_{chr06}* при мутанта, а проведенният RT-PCR анализ потвърждава, че има транскрипт на *CrtZ_{chr06}* гена при сорт Оранжева капия. Резултатите показват, че запазената секвенция, както вероятно и функция на гена *CrtZ_{chr06}* при мутантния сорт, се оказва недостатъчна, за да компенсира ефекта от делецията на *CrtZ_{chr03}*.

От проведените конвенционални PCR с праймери, локализирани на различни разстояния от *CrtZ_{chr03}* гена, се установява, че облъчването с гама-лъчи, приложено върху сорт Пазарджишка капия 794, е довело до делеция на участък от хромозома 3, обхващащ гена *CrtZ_{chr03}*. Детайлната характеристика на настъпилите изменения е възможна след прилагане на геномно секвениране на цялата хромозома.

V Заключение

В заключение получените в хода на настоящата работа резултати ясно демонстрират приложимостта на ISAP метода при пипера, както и предимствата и перспективите при използването му в селекционните програми. Същевременно трябва да се отбележи, че ефективното прилагане на метода зависи от детекцията на SINE елементите, разпространени със специфична честота при пипера.

От проведените ISAP реакции при 73 генотипа пипер с праймери базирани на високополиморфни SINE фамилии при картофи е установено, че при пипера с най-голям потенциал за изследване и генотипиране са праймери SolS-II-F/R и праймери SolS-V-F/SolSR. С двете най-информативни SolS-SINE фамилии при пипера са установени специфични профили на вид *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum C. pubescense*, представителите от Перу, принадлежащи към вид *Capsicum frutescens*, Англия 1 и сортове

Куртовска капия 1619 и ИЗК Деликатес. Двете реакции дават възможност за разграничаване на тези представители в ранен етап от развитието на растенията.

При сравняване на двете най-информативни реакции при картофи и пипер се установява, че с реакция SolS-IIIa-F/R при картофите се амплифицират 7 различни профила при 8 изследвани сорта, докато при пипера с реакция SolS-II-F/R се амплифицират 5 профила от 73 изследвани генотипа. Това показва, че ефективността на SINE-базираната ISAP реакция с праймери, конструирани от генома на картофите, приложена при картофи е многократно по-висока, отколкото при близкородствения пипер.

Приложената при пипера SINE-базирана ISAP маркерна система води до амплифициране на полиморфни профили основно на видово ниво. Това предполага, че като един бъдещ аспект би могло да се разработят праймери от най-разпространените SINE фамилии в генома на пипера, който е секвениран наскоро от Qin et al. (2014) и допълнен от Kim et al. (2014). Тези праймери биха били по-надеждни за амплифициране на специфични и полиморфни профили не само на видово, но и на вътревидово ниво.

В настоящото изследване чрез използваните ISAP праймери не се установи полиморфизъм между представителите на групата изходни генотипи и индуцирани мутанти. Едно възможно обяснение на този резултат е фактът, че създадените от генома на картофа праймери не амплифицират високополиморфни SINE локуси при пипера. Възможно решение на проблема е свързано с откриване на нови SINE фамилии и тяхната честота на вариабилност при пипера, както и конструиране на праймери от секвенциите на подвижните елементи на пипер.

В получените в дисертацията резултати относно групата изходни генотипи и индуцирани мутанти RAPD маркерната система, макар и с нисък процент на полиморфизъм показва по-голяма ефективност за генотипиране на линиите и сортовете от изследваната група. От друга страна RAPD маркерите са анонимни и не могат да бъдат правени изводи и корелации по отношение на филогенетичен или еволюционен аспект, но са добра отправна точка за изследване на гени, контролиращи ценни за селекцията признаци.

Мутации, водещи до завишаване концентрациите на ценни антиоксиданти, като бета-каротена, имат важна практическа стойност за подобряване качеството на храната. Те са също и ценни, като изходен генотип за селекцията, водена по този признак, и насочена към повишаване на биоактивните вещества на плодовете на пипера. В това отношение описаната в настоящата работа предполагаема делеция на *CritZ_{chr03}* представлява интерес, като пример за ефекта на индуцираната мутагенеза върху растителния генотип и влиянието върху метаболизма на икономически значими вещества.

VI. Изводи

На основата на получените резултати са направени следните изводи:

1. Въведени са реакции при картофите, които са приложими за изследване на пипер. Най-висока информативност при пипера показват праймерни двойки SolS-II-F/SolS-II-R и SolS-V-F/SolS-V-R. За разлика от тях, при картофите информативни са SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, SolS-IIIa-F/SolS-IV-F и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, чрез които всички изследвани български сортове картофи могат да бъдат генотипирани с характерен за всеки един от тях / индивидуален ISAP профил. Наблюдаван е полиморфизъм при изследваните видове *Capsicum* чрез ISAP метод, като най-отдалечен измежду тях е *Capsicum baccatum*.
2. Установени са 16 RAPD профила, приложими при анализи на *Capsicum annuum*, като четири от избраните праймери (A 13, A 18, B 01 и B 10) водят до амплифициране на полиморфни фрагменти при избраната за изследване група от изходни генотипи и индуцирани мутанти от вид *Capsicum annuum*.
3. Мутантният фенотип на Оранжева капия (оранжев цвят на плода с високи нива на β -каротен) се дължи на делеция на участък от хромозома 3, включващ хидроксилазния ген *CrtZ_{chr03}*.
4. При мутантния генотип Оранжева капия няма промяна в секвенцията на хидроксилазния ген *CrtZ_{chr06}*, която е идентична със секвенцията на изходния сорт Пазарджишка капия 794, както и на използвания за сравнение сорт Куртовска капия 1, установено чрез проведено секвениране и последващ биоинформатичен анализ.
5. При мутантния генотип пипер е установен транскрипт на ген *CrtZ_{chr06}*, но липсва транскрипт на ген *CrtZ_{chr03}*, разположен на 3-та хромозома, респективно експресия (наличие и отсъствие) на иРНК на съответните два гена.

VII. Приноси

Оригинални научни приноси

1. За пръв път въведената за изследване при Solanaceae ISAP техника с праймери конструирани чрез 9 SINE фамилии е приложена за генотипиране на 73 представители на род *Capsicum*. Две от праймерните двойки SolS-II-F/SolS-II-R и SolS-V-F/SolS-V-R имат най-голям потенциал за идентифициране на полиморфни профили при род *Capsicum*.

2. Чрез ISAP анализа, използван за първи път за молекулярно генотипиране на български сортове картофи, са амплифицирани характерни полиморфни профили при всички 8 сорта картофи, което доказва приложимостта на избраните реакции за идентифицирането им.

3. Установени са 4 RAPD праймера, водещи да амплификация на полиморфни фрагменти при генетично близки мутантни и изходни генотипи пипер със стопански ценни признаци: A 13, A 18, B 01 и B 10.

4. Фенотипната промяна (оранжев цвят), която е резултат от натрупване на β -каротен, е свързана с откритата делеция на гена *CrtZ_{Chr03}*, водеща до липсата на ензима β -каротен хидроксилаза и невъзможността β -каротенът да се превърне в β -криптоксантин.

Научно-приложни приноси.

1. Доказана е възможността на ISAP реакциите за ранно идентифициране на образци, принадлежащи към различни видове от род *Capsicum*. Установените специфични профили на вид *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum pubescense*, представителите от Перу, принадлежащи към вид *Capsicum frutescens*, Англия 1 и сортове Куртовска капия 1619 и ИЗК Деликатес ще послужат за разграничаване на тези представители в ранен етап от развитието на растенията и успешно могат да бъдат прилагани в настоящите и бъдещи селекционни програми.

2. Идентифицираните специфични профили при картофи могат да бъдат използвани за ранна идентификация на българските сортове, защита на авторските права и свободен трансфер на генетичен материал.

3. Чрез прилагане на 4 RAPD праймера могат да се идентифицират 2 от изследваните генотипи - Златен медал *ms8* (1928) и Пазарджишка капия 794—Това прави възможно тяхното ранно идентифициране и улеснява селекционните хибридизационни програми, в които се включват.

4. Предполагаемата делеция на ген *CrtZ_{chr03}* води до липсата на амплифицирани фрагменти, което се прилага като молекулен маркер за ранен отбор на растения с мутантен генотип в текущите селекционни програми, водени по този признак.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

- Спасова-Апостолова, В., Томлекова, Н. и Тодорова, В., 2014. Провеждане на молекулно маркерна селекция при пипер за повишаване на качеството и избора на донори за F1 хибриди. Научни трудове. Съюз на учените в България, Пловдив, Том „Техники и технологии“ стр. 21-26.
- Tomlekova, N., Spasova-Apostolova, V., Nacheva, E., Stoyanova, M., Teneva, A., Petrov, N. and Schmidt, T., 2017. Genotyping of Bulgarian potato varieties by SINE-based ISAP markers. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 70: 61-70.
- Tomlekova, N., Spasova-Apostolova, V. and Panchev, I., 2016a. Characterization of mutation affecting a region of the chromosome 3 in orange-coloured and beta-carotene-rich mutant registered as the variety Oranzheva kapiya. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 69: 145-150.
- Tomlekova, N., Spasova-Apostolova, V. and Panchev, I., 2016b. RAPD analysis of Bulgarian Pepper Induced Mutant. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 69: 731-738.

Summary

DOCTORAL THESIS

Molecular characterization of the collection of mutants and near related peppers

Velichka Volodieva Spasova-Apostolova

The pepper is the second important vegetable crop in Bulgaria. Establishment of specific polymorphic profiles and genotyping pepper-accessions allows to shorten the breeding process. The identification of mutations leading to higher beta-carotene concentrations, especially important for breeding programmes for increasing the biological value of pepper fruits.

The level of the polymorphism of the collection of 73 pepper genotypes with SINE-based ISAP reactions was studied. Two primer pairs that generated the most different profiles for the collection were found. The reactions with primer from SolS-II-family generate five different profiles and reactions with SolS-V-family generate four profiles. The results of SINE-based ISAP reactions indicate polymorphism mainly to *Capsicum* species. The most different profiles were generated between *Capsicum annuum* and *Capsicum baccatum* accessions.

The ISAP reactions, with primer combinations SolS-IIIa-F/R and SolS-IIIa-F/SolS-IV-R give the possibility to identify eight Bulgarian potato varieties (Iverce, Nadezhda, Orfei, Perun, Pavelsko, Rozhen, Kalina and Bor) explored by a different DNA patterns.

To establish a polymorphism in the group of induced mutants, was included additional molecular marker system – RAPD. As a result were found four primers A13, A18, B01 and B10 generate polymorphic bands for genotypes Zlaten medal *ms8* and Pazardzhishka kapiya 794.

For molecular characterization of the mutant cultivar Oranzheva kapiya were conducted 34 PCR reactions for the wild and mutant genotypes. By PCR reactions were observed amplified fragments with expected length only for the wild type cultivar Pazardzhishka kapiya 794.

In result of *CrtZ_{chr03}* and *CrtZ_{chr06}* genes sequencing with three genotype peppers - mutant, wild type and cultivar Kurtovska kapiya 1, were observed that the gene *CrtZ_{chr06}* was sequenced in all three genotypes, but no sequence of the gene *CrtZ_{chr03}* in mutant genotype.

The results from RT – PCR reactions with primers pairs for genes *CrtZ_{chr03}* and *CrtZ_{chr06}* for wild and mutant genotypes, show an expression of the *CrtZ_{chr06}*, but no expression of the gene *CrtZ_{chr03}* for mutant genotype.

By PCR reactions with primers positioned at a different distance from both sides of the target gene *CrtZ_{chr03}*, were amplified fragments only from the wild type and cultivar Kurtovska kapiya 1. The mutation in mutant genotypes Orangeva kapiya covers a larger segment of the 3th chromosome.