Авторска справка за приносите от научно-изследователската дейност на доц. д-р Елена Георгиева Тодоровска

Последните две десетилетия бележат нова ера в геномните изследвания на човешкия и голям брой микробиални, животински и растителни геноми. Необходимостта от идентифициране функциите на гените и техните взаимодействия в контекста разшифроване на сложните механизми на устойчивост към различни стресови фактори и синтезата на важни за клетката и организмите белтъци и ензими, доведе до бурното навлизане на „омикс" технологиите, в това число и на новите високо-технологични платформи за секвениране на геномите на представители на различни таксономични групи.

Наред с разработените на основата на полимеразна верижна реакция (PCR) ДНК маркери (RAPD, AFLP, SSR, EST-SSR, ISSR и др.) в края на 20-ти век за генотипиране и картиране на важни QTLs, идентифицирането на голям брой гени за важни признаци и откритието на SNP/Indels в тях, определящи различната им фенотипна изява, позволи разработване на известен брой функционални (алел-специфични) маркери при някои животински и растителни видове. Последните позволяват директна селекция на индивиди, сортове и линии растения (MAS) с подобрени агрономически показатели и тяхното по-нататъшно приложение в селекционните програми при различни домашни животни и културни растения.

Макар, че броят на секвенираните геноми от растително, животинско и човешко естество расте с неимоверни темпове, броят на организмите, чийто геноми предстоят да бъдат секвенирани и разшифровани все още е голям. Поради това, съвременните методи на молекулярната биология за изолиране на нови, неизвестни гени, тяхното функционално охарактеризиране и проучване на биологичната им роля са и ще продължат да бъдат основно предизвикателство пред световната научна общност и през следващите няколко десетилетия.

Основна част от научно-изследователската ми дейност е свързана с приложение на съвременни молекулни маркери (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, SNP и др.) за комплексно охарактеризиране на генетичните ресурси от важни за България селскостопански култури с оглед по-ефективното им използване в селекционните програми; изолиране, клониране на гени и тяхното охарактеризиране; генна експресия; *in vitro* култивиране, получаване и анализ на трансгенни растения.

Експерименталната ми работа по изследваните проблеми е осъществена изцяло в България. Част от посочените резултати и постижения са получени в рамките на съвместни изследвания с колеги от ръководената от мен група „Функционална генетика - Житни", при АгроБиоИнститут, ССА и/или в колаборация със селекционните институти на ССА, Институти на БАН, СУ „Св. Кл. Охридски", ТУ – Ст. Загора и АУ - Пловдив по национални и международни проекти, както и в рамките на няколко краткосрочни специализации в CRAW - Gembloux, Белгия, Полша и Кипър.

I. Молекулни маркери за характеризиране на растителни и животински генетични ресурси

Проблемът за съхранението и правилната експлоатация на генетичните ресурси както от диви така и от културни видове растения и животни, независимо от огромния брой изследвания през последните две десетилетия в глобален и национален мащаб, продължава да бъде актуален и на настоящия етап поради все по-бързите темпове на изчезване на голям брой видове. Загубата на растителни и животински генетични ресурси има сериозни последствия за устойчивото развитие на селското стопанство и производството на хранителни продукти. Освен предотвратяване стесняването на генетичното разнообразие, изразяващо се в намаляване броя на растителните и животински видове, запазването на сравнително високо ниво на генетично разнообразие в рамките на вида е от съществено значение. За съжаление, броят на публикуваните съобщения за загуба на ценни алели и опасност от генетична ерозия в резултат на съвременните селекционни и развъдни практики при основните растителни култури и селскостопански животни в световен мащаб и непредсказуемите климатични промени нараства. Продължаването на тази тенденция ще има изключително сериозни последствия не само върху устойчивостта на растенията и селскостопанските животни към заболявания, вредители и патогени, но и върху тяхната пластичност към промените в околната среда.

Това налага необходимостта от цялостно проучване нивото на генетично разнообразие при икономически важните за страната ни растителни култури, каквито са обикновената (хексаплоидната) и твърдата (тетраплоидната) пшеница, царевицата и други растителни видове, чиито продукти имат изключително благоприятно влияние върху човешкото здраве. Пред съвременната селекция на житните култури са поставени високи изисквания за качество на зърното, устойчивост на патогени и абиотични стресови фактори, висок и стабилен добив и др., в основата на което е наличието на високо ниво на генетично разнообразие, т.е. широка генетична база, позволяваща редуциране на генетичната ерозия и по-висока адаптивност към променящите се условия на средата и стабилни добиви. В този аспект, предстоящите пред обществото задачи (научни колективи и селекционери) през следващите няколко десетилетия са създаване на нови и подобрени сортове с устойчивост на комбинации от различни стресови фактори. Постигането на тази амбициозна и крайно наложителна цел изисква не само цялостна (фенотипна, геномна, протеомна и метаболомна) оценка на генетичните ресурси за идентифициране на родителски форми с ценни алели, но и разработване на подходящи модели за прогнозиране на най-благоприятните алелни комбинации при определени условия на средата.

Един от подходите, използвани в селекционните практики за повишаване нивото на генетично разнообразие, включва отдалечена хибридизация и кръстоски с местни популации и диви видове. Интродуцирането на генетичен материал от близки и далечни видове или сортове, директно селектирани от местни популации, носещи гени за

устойчивост на биотичен и абиотичен стрес са едни от основните методи за разширяване на съществуващото генетично разнообразие и повишаване адаптивността на обикновената и твърдата пшеница. Често обаче, интродукцията на чужд генетичен материал води до значително понижаване качеството на зърното (Тодоров и сътр., 2002). Този факт налага обстойно проучване на генетичната отдалеченост на генотиповете, използвани като родителски форми в кръстоските, наличието на конкретни гени с важно стопанско значение в техните геноми, както и селекция в ранна фаза на генотипове от сегрегиращите (разпадащите) популации, носещи максимален брой икономически важни признаци, което може да бъде постигнато чрез селекция, основана на ДНК маркери (MAS - Marker Assisted Selection).

Генетичните ресурси в животновъдството включват огромно разнообразие от породи селскостопански животни и техните популации, които са се развили и адаптирали към разнообразните условия на околната среда в продължение на векове. По данни на Организацията по прехрана и земеделие (FAO) и Европейската асоциация по животновъдство (EAAP), 18% от местните породи в Европа, съществуващи в началото на XX век са загубени, а 40% от регистрираните такива са в риск през следващите двадесет години (Signorello and Pappalardo, 2003; Simianer et al., 2003). Изнесените резултати, представляващи част от глобалното изследване на FAO (2007) относно състоянието на животинските генетични ресурси в страните от Централна и Източна Европа, включително и България, показват че реалното намаляване на биологичното разнообразие на ниво порода е активно продължаващ процес.

Изчезването на застрашените породи селскостопански животни води до необратима загуба на генетично разнообразие в природата. Критичната граница на съществуване, на която се намират стотици уникални породи домашни животни в света и Европа поставят на дневен ред проучването и оценката на разнообразието на генетичните ресурси в животновъдството с оглед тяхното съхранение, ефективно управление и рационално използване (Fernández et al., 2011). Редовният мониторинг е наложителен и поставя изисквания за проверяване актуалния статус на популациите и оценка на тенденциите за размера и структурата на породите (популациите), географското им разпространение, рисковия статус и генетичното разнообразие. Ето защо основните приоритети, заложени в "Конвенцията за биологично разнообразие" са оценка и разработване на стратегия за мониторинг на генетичните ресурси на различните породи (популации) животни.

Известно е, че местните породи животни притежават редица характеристики, които ги отличават от опитомените - висока екологична пластичност, устойчивост към инфекциозни и паразитни заболявания и добро съчетание на стопански полезни признаци (по-голяма издържливост, по-добро оползотворяване на фуража, по-високо качество на продукцията, здрава конституция, висока заплодяемост и плодовитост, по-голяма продължителност на живота) и не на последно място тяхното съществуване има икономически, исторически и социално-културен характер за местното население. Общоприето е (FAO; http://www.fao.org/home/en/), че при определяне на показателите за оценка на генетичното разнообразие е необходимо да се използват съвременни молекулни маркери (SSRs и понастоящем SNPs), както за оценка на вътре- и междупородното разнообразие, така и за установяване на регресивни явления или

фрагментиране на породите.

Намаляването на числеността и изчезването на цели местни породи вече е факт и в България, най-често поради замяната им с по-продуктивни и специализирани такива или чрез кръстосване с тях. В дългосрочен план, този генофонд може да се окаже изключително полезен в бъдеще по отношение новите изисквания на пазара и глобалните климатични промени. Ето защо, опазването на редки и застрашени от изчезване породи е било в полезрението на редица изследователски колективи (Hinkovski and Alexiev, 1981). Изхождайки от глобалната стратегия на FAO за управление на генетичните ресурси в животновъдството, Хинковски и Стойков (2001) посочват, че фундаменталният проблем на животновъдството в България е създаване на молекулярна база с данни за домашните животни от местните породи, с оглед изработване на програми за тяхната консервация и ефективно използване на екологичната им стойност за получаване на качествени продукти от тях.

Развитието на молекулярната биология, биотехнологиите и биоинформатиката доведе до разработването на широк набор от генетични маркери и биоинформатични подходи (*in silico*) за откриване на ДНК полиморфизми в геномите на различни видове организми, в това число и на селскостопанските животни. Молекулните маркери представляват надеждно и изключително ефективно средство за анализ на генетичното разнообразие, генотипна идентификация и оценка на евентуалната опасност от генетична ерозия. Понастоящем в селекционно-подобрителните програми молекулните маркери се използват за подпомагане избора на подходящи родители за кръстоски, за генно картиране или маркиране на гени и генни блокове, свързани с икономически важни признаци, както и за ефикасно установяване и използване на еволюционните връзки между организмите. Едно от най-съществените преимущества на молекулните маркери се изразява в насочване на селекцията от фенотипна изцяло към генотипна (MAS). MAS предоставя възможност за лесен и бърз отбор на генотипове, носещи признаци, чиито фенотип е трудно да бъде определен, както и за улесняване селекцията на сортове и линии, и животни носещи максимален брой ценни икономически признаци още в ранна фаза от развитие на организмите и на ранен етап на селекционния процес.

За съжаление, за разлика от бързото развитие и внедряване на „омикс" технологиите в света и успешното им прилагане макар и с по-бавни темпове при редица растителни обекти в България, е налице чувствително изоставане в животновъдния сектор в това отношение.

<u>Поднаправление I</u> - Характеризиране на генетични ресурси от житни култури (пшеница, царевица и ечемик) с протеинови и ДНК маркери (RFLP, RAPD, STS, REMAP, AFLP, SSR, ISSR, SNP)

- Молекулни маркери за генотипиране, идентификация, определяне чистотата и хомогенността на сортове и линии от колекциите в основните селекционни центрове в България, и изследване на генетичното разнообразие;
- Молекулни маркери за доказване на интрогресия на геномни сегменти от далечни и близки родственици в генома на културната пшеница;
- Приложение на молекулни маркери за повишаване ефективността на селекционните програми по студо- и сухоустойчивост;
- Разработване на мултиплексна PCR методология за бързо и ефективно генотипиране на популации за картиране на QTLs
- Идентифициране на SNPs и индели в гени от сигнални пътища, включени в отговор към стреса.

<u>Хексаплоидна пшеница</u> (*Triticum aestivum* L., 2n=6x=42, **AABBDD):**

1. Установяване нивото на хомогенност на български сортове пшеница

Проведеното изследване представлява сравнително обстоен анализ на вътресортовата вариабилност на 5 български сорта обикновена пшеница (AABBDD) от колекцията на ДЗИ, Г. Тошево, създадени в периода 1981-1996г., с помощта на биохимични (високо и ниско молекулни глутенини - HMW-GS, LMW-GS и глиадини – Gli, кодирани от локуси върху 1-ва и 6-та група хромозоми) и 40 микросателитни маркери, разпределени върху всички 7 хомеоложни групи (**Публикация № 3 от конкурса за „Професор”)** с оглед по-прецизна оценка нивото на хетерогенност - **факт от изключителна важност при подбор на родителски форми за включване в хибридизационните програми; производство на сертифициран посевен материал; защита на авторски права върху сортовете и регистрация в патентното ведомство**. Същевременно то представлява и сравнителен анализ на приложените маркерни системи по отношение тяхната ефективност в такъв род изследвания.

На основата на биохимичните маркери са установени 4 биотипа за сортовете Скития и Янтър и по 2 – за Кристал, Калоян и Пряспа. Сред анализираните биотипове, с по-добри хлебопекарни качества се открояват Янтър 3 (общ Glu score =18), Пряспа (общ Glu score =17), Калоян 2 (общ Glu score =15), Скития 4 (общ Glu score =15) и Кристал 2 (общ Glu score =12) - факт, зависещ изключително от комбинациите на специфични алели в локусите за високомолекулните глутенини (HMW-GS). Независимо, че Янтър и Скития са представени от 4 биотипа, сорт Скития е много по-хетерогенен от Янтър, поради факта, че четирите му биотипа се различават в значително по-голям брой анализирани локуси - тези, кодиращи субединици *Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1, Glu-B3, Glu-D3* и частично в локуса за *Gli-1*. **Установено е, че биотип Скития 2 притежава рядка комбинация от алели в локус *Glu-B1*(субединици 6+9), която не се открива в останалите генотипове.** Сорт Пряспа, получен чрез пряка селекция от Янтър показва голямо сходство по отношение на електрофоретичните профили на резервните протеини с Янтър. Биотиповете Янтър 1 и Пряспа не могат да бъдат разграничени въз

основа на електрофоретичните профили на глутелините и глиадините, докато мутантната линия Пряспа 1 се отличава от Пряспа и съответно от Янтър 1 единствено по липсата на субединица 7, кодирана от *Glu-B1* локуса (1BL). Проведеният анализ на нивото на вариабилност на дефинираните 14 биотипа пшеница в 40 микросателитни локуси, разпределени в генома на пшеницата показва наличие на полиморфизъм в 37 от тях (92.5%). Установената стойност за вероятност на идентичност на биотиповете ($PI=5.296 \times 10^{-16}$) е ясна индикация, че приложеният набор от SSR маркери е достатъчен за получаване на уникален ДНК профил (фингерпринт) за всеки един от тях. Доказателство за този факт е, че с изключение на биотипове Янтър 1 и Янтър 2, всички останали могат да бъдат разграничени (идентифицирани). Проведеният от нас микросателитен анализ предостави маркер за разграничаване на Пряспа 1 от Пряспа и от 4-те биотипа на Янтър в локус *Xgwm389(3B)*. Сред изследваните сортове най-хетерогенен е сорт Скития (вариабилност в 77.5% от анализираните локуси), следван от Калоян (65%), Янтър (15%), Кристал (7.5%) и Пряспа (5%). Наблюдаваното високо ниво на вариабилност в сортовете, получени от по-сложни кръстоски се дължи най-вероятно на остатъчна хетерозиготност на родителските форми на сортовете, участващи в кръстоската и/или неизравненост на получения сорт.

Установената положителна корелация (r=0.921; p<0.001) между "кофенетичните" матрици на дендрограмите, построени на основата на генетичното сходство, изчислено с двата вида маркерни системи чрез Мантел тест (модул MXCOMP на Ntsys PC) е ясно доказателство, че двата метода могат успешно да бъдат използвани за оценка на генетичното сходство между сортове и биотипове, макар че предимствата на микросателитите при този тип анализи са безспорни, поради факта, че позволяват бърза и акуратна оценка в голям брой хромозомни локуси. Високото ниво на вътресортова хетерогенност на български генотипове обикновена пшеница, представени от два или повече биотипове потвърждава наблюдаваното от нас по-високо ниво на генетично разнообразие на българската генетична плазма, селектирана преди 2000г., дължащо се на по-високата хетерогенност на сортовете, създадени в периода 1925-2000г. (Публикация № 3 от конкурса за „Професор").

Тази хетерогенност от друга страна е предпоставка за редуциране нивото на генетичната ерозия в резултат на използване най-често на едни и същи хомогенни сортове в практиката. Нашите изследвания в тази насока показват (Публикация № 8 от конкурса за „Професор"), че сортовете, създадени след 2000г. са много по-изравнени и се характеризират с по-ниско ниво на генетично разнообразие – факт, изискващ повишено внимание, във връзка с генетичната ерозия и генетична уязвимост по отношение на устойчивост към биотични и абиотични стресови фактори и произтичащата от това редукция на продоволствената сигурност.

2. Микросателитни маркери, свързани с агро-екологичната адаптация на пшеницата

Представени са резултати (**Публикация № 8 от конкурса за „Професор", Постер №29 от предходна хабилитация**) от анализа на генетичното разнообразие в 32 микросателитни локуси в 158 сортове и линии обикновена (хексаплоидна) пшеница от

колекциите на ДЗИ, Г. Тошево и CRAW, Gembloux, Белгия, които ясно показват, че най-високо ниво на генетична вариабилност се наблюдава във **B** генома на пшеницата (среден брой алели 11.83 и GD=0.735), факт, потвърждаващ изследванията на редица автори в това отношение. Най-голям брой алели и най-висока стойност на генетично разнообразие (GD) за изследваната извадка от сортове и линии са установени за **7-ма хромозома** - доказателство за ниско ниво на селективен натиск върху нея. Сравнителният анализ на нивото на генетично разнообразие между двете колекции показва по-високи стойности на GD за сортовете и линиите пшеница от Югоизточна Европа (**0.614**) в сравнение с това за Западна Европа (**0.569**).

По-нататъшните анализи по генотипиране на двете колекции и на разпределението (честотите) на основните алели последователно във всеки един от общо 48 изследвани микросателитни локуси (**Публикация №8 от конкурса за „Професор”**), са явна демонстрация за различни насоки на селекцията в двата сравнявани селекционни центъра, дължащи се на агро-климатичните условия за отглеждане на пшеницата. Предпочитание на различен основен алел в селекционните програми на страните от Югоизточна и Западна Европа е установено за локуси, близко разположени до гени с важно икономическо значение като *Rht8(2D)* и *Tri(1A)*, и QTLs за студоустойчивост на 5A и 5B хромозоми и др.

Проведените изследвания демонстрират силното влияние на селекционния натиск върху преобладаването на определени алели в конкретни микросателитни локуси не само в различните агро-географски условия в Европа, но и в различните селекционни периоди. От друга страна те представляват задълбочен анализ на генетичната конституция на българските сортове хексаплоидна пшеница в сравнително голям брой хромозомни локуси, което позволява съставяне на по-детайлна картина за алелната конфигурация на всеки един от анализираните генотипове, идентифициране на голям брой редки и уникални алели, които несъмнено могат да бъдат използвани в анализи, насочени към сортова идентификация, оценка на хетерогенността на материала и повишаване на алелното разнообразие в съвременните сортове хексаплоидна пшеница. Наблюдаваната редукция в нивото на генетично разнообразие в сортовете пшеница, създадени след 2000г. е сериозно предизвикателство пред българската селекция при пшеницата, изискващо търсене на нови източници за поддържане на високи нива на генетична вариабилност при тази култура и постигане на максимално най-благоприятното съчетание на алели за устойчивост към биотични и абиотични фактори, качество на зърното и висока пластичност. Създадената база данни за алелните варианти в анализираните микросателитни локуси е налична в група „Функционална Генетика Житни”, при АгроБиоИнститут и може да бъде използвана както за комерсиални (селекционери, фермери и др.), така и за научни цели.

Изследването е в съзвучие с основните въпроси на популационната и еволюционна генетика, насочени към проучване каква част от ДНК вариабилността присъстваща в природата в рамките на даден вид е неутрална или под селективен натиск, и следователно има значение за адаптацията (Koornneef, 2009 г.). Освен научна значимост този въпрос има и практическа стойност, когато се отнася за опазване на генетичните

ресурси. Въпреки трудностите, които все още съпътстват изследванията, свързани с възможностите на молекулярната биология в съчетание с биоинформатичните подходи за оценка количеството на неутралните вариации в растителните колекции, резултатите от проведените от нас изследвания в това направление дават известна информация относно адаптивния компонент на промяната и очертават необходимостта от по-нататъшни изследвания в тази област.

Това, което липсва на настоящия етап е все още недостатъчната информация за гените и мутациите в тях, имащи адаптивна значимост, т.е., идентифицирането на тези гени (в повечето случаи локуси за количествени признаци - QTL гени) и адаптивните мутации в тях (нуклеотиди за количествени признаци - QTN).

От друга страна, остава открит въпросът, широко дискутиран в Европейското пространство за възможностите за отглеждане на западноевропейски сортове в климатичните условия на България и Югоизточна Европа и пълно разкриване на техния потенциал при традиционните за тази част на Европа агротехнически практики, както и в маргиналните производствени системи.

3. Алел-специфични маркери за идентифициране на алелни варианти в локусите за яровизация (*Vrn)*, фотопериода (*Ppd)* и нискостъбленост *(Rht1* и *Rht8*) при български сортове и линии пшеница и проучване ефекта на различните алелни комбинации върху някои елементи на добива и изкласяването.

Информацията за потенциала на съществуващите алелни комбинации на гените за екологична адаптация (***Vrn, Ppd)*** при пшеницата е в основата на излъчване на такива, които са свързани със значително съкращаване на вегетационния период. В този аспект, изследването е насочено към определяне на алелното вариране в локусите ***Vrn***, ***Ppd, Rht1*** и ***Rht8*** при български сортове и линии, и местни сортове пшеница. На основата на използването на диагностични алел-специфични молекулни маркери са определени алелните варианти в локусите за яровизация върху 5-та група хромозоми (***Vrn-A1***, ***Vrn-B1*** и ***Vrn-D1)*** и *7BS* хромозома (***Vrn-B3),*** фотопериодична реакция ***(2D)*** и тези за полу-джуджевиден статус (нискостъбленост) - ***RhtB1(4B)*** и ***Rht8(2D)*** на сортове, селекционни линии и стари местни форми (линии) обикновена пшеница от колекциите на ДЗИ, Г. Тошево, ИРГР, Садово и ИФРГ, БАН. (**Публикации №10 и №12 и Постери №№1, 10, 11 от конкурса за „Професор"). Създадена е база данни за алелните варианти в анализираните локуси за изследваните сортове и фенологичните наблюдения, налична в група „Функционална Генетика Житни", АгроБиоИнститут и ДЗИ, Г. Тошево и са идентифицирани алелните комбинации за всички анализирани в това изследване генотипове пшеница. Базата данни може да бъде използвана от селекционери и фермери при планиране на кръстоски между изследваните сортове и линии, с което ще се улесни селекцията на генотипове с желани адаптивни характеристики**.

Проведените молекулярни анализи показват преобладаване на гените, определящи зимен тип на развитие (хабитус) **(*vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1*; *vrn-B3*)** както в старите, така и в съвременните сортове и линии пшеница от колекциите на ДЗИ, Г. Тошево и ИРГР, Садово, с по-голям превес във съвременните сортове. Доминантните алели (***Vrn-A1a, Vrn-A1b),*** отговорни за пролетен тип на развитие се откриват само в 2 сорта –

съвременния Гладиатор113 и стария сорт Карнобатска ранозрейка, като в последния тези два алела са представени в комбинация. Доминантният алел ***Vrn-B1***, отговорен за пролетен тип хабитус се открива само в старите сортове и местни форми пшеница, но не и в съвременните, докато пролетния тип алел ***Vrn-D1*** – само в няколко стари и един съвременен сорт (Ласка). Последните два алела **(*Vrn-B1*** и ***Vrn-D1)*** в комбинация с рецесивния алел върху 5А хромозома **(*vrn-A1),*** определят зимно-пролетен хабитус, какъвто имат сорт Ласка и някои стари сортове и местни форми.

Фотопериод чувствителният алел **(*Ppd-D1b*)** преобладава в старите сортове и местни линии (~91%), докато нечувствителният алел **(*Ppd-D1a*) –** в съвременните сортове пшеница (>95%).

В нашето изследване дивият тип алел (***Rht-B1a***) за височина на стъблото върху 4В хромозома се открива и в 3-те изследвани групи 6х пшеница. Гиберелин-нечувствителният ген (мутантния алел ***Rht-B1b***), свързан с редуцирана дължина на стъблото е открит в няколко от изследваните съвременни сортове.

В близко локализирания до гена за ниско стъбло ***Rht8*** (2D) микросателитен локус *Xgwm261*(2DS) са открити 7 алела, от които 164бд (*Rht8a*), 212бд и 216бд (*Rht8f*) са специфични само за старите сортове и местни форми пшеница. От алелите 164 бд (*Rht8a*) и 174бд (*Rht8b*) в локус *Xgwm261*(2D), преобладаващи във съвременните фотопериод чувствителни сортове от Западна Европа (**Публикация №8 и постер №1 от конкурса за „Професор"; Публикация №23 от предходна хабилитация)**, единствено алел 174 бд (*Rht8b*) се открива в част от съвременните фотопериод нечувствителни български сортове – предимно в тези до 2000г. и пролетния фотопериод чувствителен сорт Гладиатор 113.

Съвременните сортове, притежаващи комбинация от алели за фотопериод нечувствителност и зимен хабитус **(*Ppd-D1a//vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1*; *vrn-B3*)** се характеризират с по-ранно изкласяване, в сравнение с тези, притежаващи комбинацията ***Ppd-D1b//vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1; vrn-B3*** (чувствителност към фотопериода и зимен хабитус)**.** Преобладаването на генотипове с алелна комбинация ***Ppd-D1a//vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1; vrn-B3*** в българските селекционни програми може да бъде обяснено с тяхната висока адаптивност към местните климатични условия. **От друга страна комбинацията от алели за фотопериод нечувствителност, зимен хабитус с тези за полу-джуджевидност** – ***RhtB1b*** и ***Rht-8c*** (алел 192бд в локус *Xgwm261*) или ***RhtB1b*** и ***Rht-8d*** (алел 202бд в локус *Xgwm261*) **води до редукция във времето на изкласяване, наблюдавано при сортове Русалка, Галатея, Катя, Кристал 1, Плиска и Енола**.

Програма, целяща установяване ефекта на комбинацията от алели на гени за екологична адаптация (***Vrn1*** и ***PpdD1***) и нискостъбленост (***Rht-B1)*** върху някои компоненти на добива е инициирана чрез анализ на получените нови линии от кръстоска между 2 типа пшеница - фотопериод чувствителен пролетен и фотопериод нечувствителен зимен тип (**Публикация №10 от конкурса за „Професор")**.

Сред селектираните на основата на приложените алел-специфични маркери и гиберелинов тест зимно-пролетни и пролетни генотипове от проведените кръстоски, изпитани при 2 режима на засяване – есен и ранна пролет, фотопериод нечувствителните пролетни генотипове (с алелна комбинация *Ppd-D1a//Vrn-A1, vrn-B1, vrn-D*) показват най-ранно време на изкласяване и редуцирана дължина на

стъблото. Проучването предоставя информация, че фотопериод чувствителните и нечувствителни алели (*Ppd-D1b* и *Ppd-D1a)* в комбинация с пролетния алел (*Vrn-A1)* дават и по-висок добив от зърно/м^2.

Проведените изследвания са в съзвучие с приоритетите на Европейските програми за разширяване познанията за екологичната адаптация на пшеницата с оглед запазване и разширяване на традиционните области на нейното разпространение.

Освен създаване на нови за условията на България сортове (зимно-пролетни и пролетни) чрез нови комбинации от генни комплекси с оглед увеличаване на генетичното разнообразие и подобряване на някои характеристики – добив, по-ранно изкласяване, те предоставят и информация относно възможностите за повишаване пластичността на съществуващите сортове и продуктивността в условията на съществуващите флуктуации в климата на Балканския полуостров.

4. Маркери, асоциирани с по-високо ниво на студоустойчивост на български сортове хексаплоидна пшеница

Анализът на микросателитни локуси върху дългото рамо на 5A, 5B и 5D хромозоми в интервала ***центромера – Vrn1*** при 10 български и 5 чужди сортове пшеница от колекцията на Г. Гошево и Садово с дефинирани нива на студоустойчивост разкри **SSR маркер (алел 176 бд) при най-студоустойчивите български сортове - Милена, Победа Садово 1 и чужди - Мироновская 808 и Безостая 1, в локус *Xwmc327,* отстоящ на около 2 - 4 cM от основния локус за студоустойчивост *Fr-A2* върху 5AL хромозома. Идентифицираният алел може да се използва като маркер за ускорена селекция на генотипове (MAS - Marker Assisted Selection) с по-високи нива на студоустойчивост в бъдещи селекционни програми**.

Асоциация на алел 172бд макар и по-слаба с високо и средно ниво на толерантност към измръзване е установена в локус *Xgwm639* (5BL), намиращ се в близост до ***Fr-B1*** локуса върху дългото рамо на 5B хромозома. Допълнителни анализи ще позволят установяване на тясно скачени с *Fr-B2* и *Fr-D2* локуси молекулни маркери, които ще позволят използването им в селекцията за бърз и ефективен отбор на студоустойчиви генотипове.

Тези изследвания са в съзвучие с Европейските насоки по „***Подобряване адаптивността и устойчивостта на житните култури”*** като основен приоритет, поради непредвидимите флуктуации в климата. Изискването към новите сортове е да допринесат за увеличаване на адаптивността и устойчивостта в селското стопанство (Stamp, 2009). Адаптивността е необходима, тъй като условията, при които се осъществява производството стават все по-трудно предвидими по отношение на водни запаси, високи и ниски температури и други екологични променливи (Karamanos, 2009 г.). Обръща се специално внимание на гъвкавостта, способността за възстановяване след шока или стреса, за осигуряване на продуктивност при неблагоприятни условия.

<u>Твърда пшеница</u> (*Triticum durum* Desf., 2n=4x=28, AABB**):**

1. Молекулярна и фенотипна оценка на бекросни линии пшеница, получени чрез междувидова хибридизация на сортове твърда пшеница с близки и далечни родственици.

На основата на прилагане на 33 SSR и 3 ISSR маркери е установена интрогресия на геномни сегменти от близки и далечни родственици на твърдата пшеница (род *Triticum* и род *Aegilops*) в бекросни линии в начален (BC_1F_3, BC_1F_4, BC_2F_3, BC_2F_4) и напреднал стадий на селекция (BC_1F_5, BC_1F_6), получени в резултат на междувидови кръстоски и е определена ефективността на пренос на чужд генетичен материал в твърдата пшеница (**Публикации №16 и №25 от конкурса за „Професор”**). Най-висок процент интрогресии от тетраплоидните културни видове в генома на твърдата пшеница на основата на SSR маркерите е установен в сорт Прогрес от ***T. polonicum*** **(36.84%)** и ***T. dicoccum*** **(34.78%)**, докато този от хексаплоидните културни видове – в сортовете Възход и Прогрес от ***Triticale*** **(41.66%)** и ***T. macha*** **(26.66%).** Интрогресия на ДНК фрагменти в генома на сортовете Прогрес и Възход от близкородствените и отдалечени видове ***T. polonicum, T. macha*** и ***T. timopheevii*** е установена и с приложените ISSR маркери, което е индикация, че последните, в комбинация със SSR маркерите са надеждно средство за доказване на интрогресионни събития. Ниско ниво на интрогресия на хроматин в генома на твърдата пшеница при прилагане на двата вида маркерни системи се наблюдава в случаите на използване на отдалечените видове ***Ae. umbellulata*** и ***Ae. tauschii***. **От анализираните сортове, сорт Прогрес проявява най-висока отзивчивост към интрогресии, което е предпоставка за включването му в бъдещи селекционни програми.**

Получените в проведеното изследване бекросни линии се характеризират с подобрени агрономически признаци - по-ранно време на цъфтеж, по-широк и/или по-дълъг флагов лист, по-голям брой класчета/клас, по-високо съдържание на белтък и глутен и др. - качества, които все по-трудно се постигат в съвременната селекция, основана на вътревидова хибридизация. **Те са основа за създаване на нови сортове с повишена толерантност към биотичен и абиотичен стрес; за целите на биологичното земеделие, като източник на здравословни храни за човека и за по-нататъшно повишаване на генетичното разнообразие при твърдата пшеница чрез включването им в хибридизационните програми.**

Тези резултати корелират с Европейските директиви за редуциране уязвимостта на съвременните сортове към вредители, патогени и/или рискове от околната среда чрез въвеждане на нови гени/алели от близки и далечни родственици в зърнените култури, повишавайки по този начин не само пластичността им чрез разширяване на тяхната генетична база, но позволявайки и проучвания върху природата и нивата на рекомбинации, търсенето на полезни гени и идентифицирането на ко-адаптирани генни комплекси.

Царевица

1. Оценка на интродуцираното чрез мутагенезис и реципрочна мутационна селекция генетично разнообразие

Генофондът на житните култури, в това число и царевицата е от изключителна важност за ефективността на селекционно-подобрителните програми. В България се използват ограничен брой донори на генетична плазма при царевицата, принадлежащи главно към две противостоящи в хибридизацията хетерозисни групи (SSS и Lancaster), 8

и 16 линейни синтетични популации, елитни прости и двойнолинейни хибриди и сортове царевица, с ценни стопански качества. Значителното понижаване на генетичното разнообразие наблюдавано в цял свят, в това число и у нас, е закономерно следствие от масовото използване на метода „рекурентна селекция" в хетерозисната селекция при царевицата. То е свързано с гените, отговорни за адаптивната способност, толерантност към воден дефицит и други абиотични и биотични стресови фактори (Христов, 1984; Христова, 1988). В търсенето на нови възможности за обогатяване и разширяване на генетичната база при царевицата през последните няколко десетилетия широко са използвани експерименталния мутагенезис и мутационна селекция (Генов 1988г.; Христова и Христов, 1995). На основата на физически и химически мутагенезис с последваща реципрочна мутационна селекция в Института по царевицата - Кнежа са създадени голям брой мутантни линии с ясно изразени фенотипни признаци и ценни стопански качества - висока комбинативна способност, висок добив, високо съдържание на протеини и толерантност към засушаване. От тях са създадени хибриди с ценни качества, повечето от които са утвърдени и районирани за страната (Христова, 1984). Тяхното по-нататъшно използване в селекционно-генетичната дейност по подобряване на културата изискват детайлна фенотипна, биохимична и молекулярна характеристика.

В този аспект е направена оценка на 34 фенотипни показатели и биохимична характеристика на основните резервни протеини – зеини на 3 мутантни линии царевица (ФМ 4662, К 4640Б и ХМ 78-136) и техните изходни форми (В73 и В37) (**Публикация №21 от конкурса за „Професор")**. Установено е високо ниво на фенотипна вариабилност в голям брой признаци в мутантните в сравнение с изходните линии. Част от тях показват стабилно проявление в рамките на няколкогодишни полски изпитвания. По-голям брой фенотипни различия са наблюдавани между мутантните линии ФМ 4662 и К 4640Б и тяхната изходна форма. В допълнение към наблюдаваното фенотипно разнообразие, електрофоретичният профил на зеините, разкрива по-високо индуцирано разнообразие в зеиновия спектър на 2 от мутантните линии - ФМ 4662 и ХМ 78-136. **Установените белтъчни маркери за разграничаване на мутантните от изходните линии са от изключително значение за селекцията и семепроизводството при царевицата.**

Резултатите потвърждават възможностите на експерименталния мутагенезис като ефективно средство за индуциране на генетично разнообразие в елитна генетична плазма царевица.

2. Използване на генетичното разнообразие при царевицата за повишаване толерантността към засушаване

Повишаването устойчивостта на царевицата към засушаване е проблем изключително важен не само за България, но и останалите балкански държави, отглеждащи тази култура, поради значително редуциране на добивите.

Сухоустойчивостта е полигенен признак, контролиран от сложна сигнална мрежа, включваща различни биохимични пътища и множество гени. Секвенирането на генома на царевицата – факт станал реалност преди няколко години, както и множеството изолирани ESTs (Expressed Sequence Tags – кДНК-и) и гени, включени в отговор към воден дефицит са реална предпоставка за идентифициране на алелното разнообразие в

гени, кодиращи различни транскрипционни фактори, ензими, белтъци и др., участващи в защитните механизми на растенията и излъчване на функционални маркери с приложение в селекцията за бърз и ефективен отбор на сухоустойчиви генотипове.

В тази връзка е проведено частично секвениране на ген, кодиращ ***MYB-like E1*** (*MYBE1*) транскрипционен фактор имащ важно значение за метаболизма и развитието на растенията в 26 толерантни и чувствителни линии царевица от колекциите на Maize Research Institute, Zemun pole, Сърбия и Института по царевицата, Кнежа (**Публикация №17 от конкурса за „Професор”)**. Множественото сравняване на секвенциите на анализираните линии с тези на чувствителната към засушаване американска линия B73, чийто геном е секвениран, както и с тези на линии от Panzea database (http://www.panzea.org/), отразяващи функционалното разнообразие при царевицата, показа наличие на няколко мутации (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) в проучените в това изследване инбредни линии. Една от установените мутации представлява транзиция (A→G), локализирана в участъка, кодиращ киселия *Ser/Thr* – богат район на протеина, която довежда до замяна на аминокиселината триптофан в аланин в съответната позиция. **Тази уникална мутация се открива само в толерантните сръбски линии царевица T3, T5, T6, T7 и T8, но не и в останалите линии от сръбската, българската селекция, линиите от Panzea бази данни и представлява нова информация за разнообразието при тази култура.** Независимо, че посочената замяна не засяга мястото на прикрепване (свързване) на *MYBE-1* транскрипционния фактор, тя най-вероятно засяга пространствената структура на протеина, променяйки по този начин функционалната му активност. Бъдещото проучване на четвъртичната структура ще даде отговор на този въпрос.

Изследването предоставя не само информация за функционалното разнообразие при тази култура, но и за началните етапи на възприетата от нас методология за установяване на функционални маркери в гени, включени в отговор към засушаване и тяхното по-нататъшно използване в селекционните програми за повишаване стрес- толерантността при тази култура.

Секвенирането на други важни гени при царевицата, участващи в отговора към абиотичен стрес – воден дефицит ще позволи установяване на специфични хаплотипове при анализираниге образци и тяхната връзка с нивото на толерантност.

3. Разработване на флуоресцентен мултиплексен PCR за бързо и евтино генотипиране на сегрегиращи популации за QTL анализ

Разработени са бързи и евтини методи за едновременна флуоресцентна амплификация (ко-амплификация) на:

- микросателитни локуси (2 - 5) в единична PCR реакция (мултиплексен PCR) при използване на селектирани от нас комбинации от праймери за микросателитни локуси с неприпокриващ се обсег на алелно вариране (Публикация №18 от конкурса за „Професор”)

- IDP (Insertion-Deletion Polymorphism или InDel) маркери в комбинация с микросателитни (SSR) маркери в единична PCR реакция (мултиплексен PCR). (Публикация №27 от конкурса за „Професор”).

Методът се базира на адаптирана от нас multiplex-ready PCR технология (MRT^{TM}) на

Hayden et al. (2008) за флуоресцентен анализ на микросателитни и SNP алели на капилярен секвенатор. **Успешното адаптиране и прилагане на този метод при царевицата позволи автоматизиране на анализа на молекулните маркери чрез ко-амплификация на няколко локуса с един флуорофор в една PCR реакция (мултиплексиране) и едновременна детекция на голям брой локуси на капилярен секвенатор, което е постигнато чрез смесване на няколко мултиплексни реакции, белязани с различни флуорофори. Преимуществото на този метод се изразява в значително съкращаване на времето и консумативите за генотипиране на популация (**XM87-136 x B37**), състояща се от 192 дихаплоидни линии при царевицата за картиране на QTLs, експресиращи се при различни нива на азотно торене и воден запас в почвата. Възприетият подход позволява по-добро покритие на таргетните райони в генома – факт с изключителна важност при проектни решения, насочени към по-детайлно картиране на QTLs, изолиране на гени и маркер-асистирана селекция (MAS).**

Ечемик

Известно е, че *in vitro* индуцираната генетична вариабилност (сомаклонално вариране) и експерименталният мутагенезис самостоятелно или в комбинация с *in vitro* култивиране са едни от начините за обогатяване и разширяване на генетичната база при растенията. Различните мутагени (гама лъчение, NaN3, 2.4D и др.) и приложените дози от тях могат да доведат до индуциране на различни видове мутации (точкови, къси инсерции и делеции, структурни), някои от които са причина за нарушаване интегритета на генома.

Едни от основните средства за изучаване количеството и природата на естественото и индуцирано генетично разнообразие са разработените през последните 3 десетилетия ДНК маркерни системи. Сред тях, освен първа генерация ДНК маркери, основаващи се на Садърн блот хибридизация (RFLP), тези базиращи се на полимеразната верижна реакция (PCR) - RAPD, AFLP, STS, CAP, SSR, ISSR, REMAP, IRAP, SNP и др. намират изключително широко приложение в различни научни проекти и решения, относно проблемите за ефективно съхранение и обогатяване на наличното генетично разнообразие при различни растителни и животински видове.

1. Проучвания върху *in vitro* и мутаген индуцираната генетична вариабилност в генома на български сортове ечемик

Проучена е *in vitro* индуцираната генетична вариабилност в сомаклонални варианти (TCD lines) на 3 двуредни (Руен, Юбилей, Обзор) и 1 многореден (Карнобат) български сортове ечемик, получени в резултат на разработената в АБИ (бивш Институт по Генетично Инженерство) процедура по *in vitro* регенерация от калусна култура. **(Публикация №1 от конкурса за „Професор", Публикация №3 от научната продукция, във връзка с дисертационния труд)** Изследвана е и индуцираната генетична вариабилност в *in vitro* и *in vivo* регенеранти, получени от семена на сорт Руен, третирани с различни дози гама лъчение (100 и 200Gy) и NaN_3 ($5x10^{-4}$M и $5x10^{-3}$M). **(Публикация №1 от конкурса за „Професор")**

Стабилността и нивото на индуцираната генетична вариабилност в сомаклоналните

варианти (R2-R3 потомства) са проследени чрез полски изпитвания, на белтъчно (резервни протеини-хордеини) и ДНК ниво. Установен е стимулиращ ефект на някои от мутагените (200Gy) върху нивото на регенерация. Отчетеното фенотипно вариране при TCD линиите е генотипно зависимо. Няколко от тях с произход от сорт Юбилей и сорт Руен са с подобрени агрономически показатели - по-висок добив, с по-късо стъбло, по-ранно изкласяване и др. Приложените белтъчни и ДНК маркери разкриват полиморфизъм както в електрофоретичния профил на С хордеините, така и в кодиращите ги генни секвенции при индивидулни растения на сомаклон 70R с произход от сорт Юбилей. RFLP полиморфизъм в генните секвенции за митохондриалната ATP се наблюдава в сомаклоналните варианти 81 и 83 на сорт Руен, докато RAPD анализът с 20 различни 10-mer праймери разкрива полиморфизми съответно в 3 и 2 сомаклонални варианти с произход от сортове Руен и Карнобат. RAPD полиморфизми са установени и в мутантни линии, получени след *in vivo* и *in vitro* третиране с NaN_3 ($5x10^{-3}$M). Причините за ограничения брой полиморфизми са предварителна селекция на част от линиите за белтъчен и ДНК анализ, основана на отчетеното фенотипно вариране от една страна и второ - лимитирания брой маркери, покриващи сравнително малка част от генома на ечемика.

Анализите показват, че *in vitro* култивирането е ефективно средство за индуциране както на желани, така и на нежелани промени в генома на ечемика. Повечето от анализираните линии се характеризират с подобрени агрономически показатели и могат да се използват в селекционно-подобрителните програми при тази култура.

2. Изследване на молекулярната вариабилност в генома на структурни мутанти ечемик

Изследвани са нивото и стабилността на унаследяване на индуцираните мутации в генома на серия от структурни мутанти (Gecheff, 1996; Gecheff, 1996), получени в резултат на физически мутагенезис (йонизираща радиация) с използване на различни маркерни системи – STS (Sequence Tagged Sequences), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), REMAP (REtrotransposon Microsatelite Amplified Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) и AFLP (Amplified Length Polymorphism) (**Публикации №7 и №14; Постер №8 от конкурса за „Професор”)**

Приложените маркери разкриват ниско ниво на генетична вариабилност в мутантните линии по отношение на изходния генотип – сорт Fraya. Изследванията показват, че само два вида ДНК маркери - SSR и AFLP от използваните 6 са подходящи за анализ на мутаген-индуцираното генетично разнообразие в структурните мутантни форми ечемик, което е от порядъка на 0.49%. Използваният мутаген е индуцирал два типа мутации - точкови и къси инсерции/делеции на ДНК сегменти, които не нарушават интегритета на геномите на анализираните структурни мутанти и се унаследяват стабилно в потомствата им. Част от наблюдаваните мутации са открити в интроните на гени за *Rubisco activase* и *Waxy protein* при 3 структурни мутанта, което поставя въпроса за по-нататъшно включване на тези линии в изследвания за чувствителност/толерантност към абиотичен стрес.

Установената ниска мутационна честата може да бъде обяснена с продължителната и целенасочена експериментална работа по създаване на реконструирани кариотипове ечемик за изучаване преди всичко на нуклеоларния доминанс, малката вероятност изследваните локуси да попаднат в мястото на разривите, както и с недостатъчното покритие в случая на хромозомите с ДНК маркери.

3. Сравнителен анализ на данни от комет анализ при растения

Един от методите с широко приложение в гено- и екотоксикологията, радиобиологията, радиацията и биомониторинга при про- и еукариотите е комет анализът – изключително надежден и чувствителен за количествена оценка на едно- и дву-верижните ДНК разриви, определяне на *in vivo* и *in vitro* репаративния потенциал на про- и еукариотните клетки и като средство за оценка на мутагенното действие на фактори от околната среда и/или антропогенната дейност, контрола и оценката на риска от определени лъчения.

Изключително важен въпрос за коректното интерпретиране на данните от комет анализа при растителните видове е точният избор на статистически подходи. Сравнителният анализ от приложението на различни статистически методи (**Публикация №11 от конкурса за „Професор”)** за оценка на данни от комет анализи (Georgieva and Stoilov, 2008) проведени с различни концентрации на радиомиметичния агент блеомицин върху ядра от ечемик, показват, като най-подходящ Джонсън SB по критерия χ^2 поради неговата гъвкавост и способността му да описва съотношения или случайни величини, ограничени от екстремни стойности.

<u>Поднаправление II</u> - Характеризиране на генетични ресурси от други важни селскостопански култури (домати и дребни плодове) с ДНК маркери (SSR и AFLP)

<u>Домати</u>

1 Изследване на генетичната вариабилност в български генотипове домати (*Solanum lycopersicum* L.)

Доматите са едни от икономически най-важните зеленчукови култури в България и в света и са ценен източник на про-витамин А (β-каротен), ликопен, витамин С и др., притежаващи антиоксидантни свойства, поради което са от изключителна важност за диетичното хранене на хора със сърдечно-съдови, метаболитни и др. заболявания. Основните проблеми съпътстващи селекцията в световен мащаб е ниското ниво на генетично разнообразие в културния тип домати (*Solanum lycopersicum* L.) – факт налагащ търсене на нови източници за неговото обогатяване.

България е една от страните с изключително стари традиции в селекцията при доматите, с принос към световната селекция изразяващ се в създаването на първия в света през 1934г. хибриден (хетерозисен) сорт. За съжаление, в продължение на години тя е провеждана изключително с конвенционални методи – оценка по фенотипни признаци. Данните за полиморфизма на ниво ДНК в колекциите от тази култура са изключително оскъдни и се базират на частични изследвания на вътресортовата вариабилност на няколко сорта с малък брой ISSR маркери (Bojinov and Danailov, 2009).

Произтичащата от това обстоятелство необходимост от по-детайлна характеристика на наличното разнообразие на ниво ДНК е предпоставка за провеждане на първото в нашата страна по-обстойно изследване на генетичното разнообразие при тази култура (Публикация №20 от конкурса за „Професор”). В проучването са включени осем генотипа домати (сортовете Пловдивска каротина и ИЗК Аля, и линиите 1116, 1140, 984, 975, 21β и 53β) от колекцията на ИЗК”Марица”, различаващи се по комплекс от показатели (агрономически и биохимични) с важност за селекцията.

Анализът е осъществен с 165 микросателитни маркери, селектирани от публично достъпните американска и японска бази данни (http://solgenomics.net; http://marker.kazusa.or.jp/Tomato) и няколко BAC клонове (Geethanjali et al., 2010; Geethanjali et al., 2011). Генотипирането на доматените образци е проведено с адаптирана от нас високо ефективна и сравнително евтина платформа за амплифициране и флуоресцентна детекция на микросателитни алели при доматите на капилярен секвенатор (ABI3730, Applied Biosystems), основана на разработената при други култури – житни (ечемик, пшеница, царевица) и овощни видове (череша, праскова) платформа (Hayden et al., 2008; **Публикации №18 от конкурса за „Професор”**). Модификацията, осъществена при тази култура включва: оптимизация на концентрацията на локус-специфичните праймери за амплификация на таргетната микросателитна ДНК последователност. От първоначално тестваните концентрации на локус-специфичните праймери (съответно 20, 30, 60 и 80nM) са избрани като оптимални следните концентрации: 20 и 30nM за SSR (http://solgenomics.net), TGS/TES (http://marker.kazusa.or.jp/Tomato) и TMS/EST (Areshchenkova and Ganal, 2002) маркери; 60 nM за SML (Geethanjali et al., 2010; Geethanjali et al., 2011) маркерите. Оптимизирани са и PCR условията, което позволи амплифициране на алели във всички 160 от общо 165 локуса при две температури на хибридизация (анийлинг) на праймерите – 50°C и 63°C. Болшинството локуси са амплифицирани на 50°C, въпреки съобщените в бази данни по-ниски температури на анийлинг за част от праймерите (от порядъка на 40-47°C).

Предимствата на приложения подход се изразяват в следното:

1. Значително редуциране на средствата за провеждане на автоматична детекция на алелите в голям брой микросателитни локуси. Досега с повечето от използваните други методологии, разработени и/или приложени от други автори за автоматична детекция в анализи по генетично разнообразие, хомогенност и чистота са амплифицирани сравнително малък брой локуси при доматите, поради това, че всеки прав праймер (Forward- F) е бил „директно” белязан само с едно флуоресцентно багрило. Това не винаги позволява пост-мултиплексиране на амплифицираните локуси и/или тяхното едновременно амплифициране в една PCR реакция, поради липса на унифицирана температура на хибридизация на праймерите за различните локуси. От друга страна, платформите, основаващи се на M13– метода, макар и сходни на използваната от нас, в повечето случаи са недостатъчно ефективни по отношение унифициране на RCR условията и коректната амплификация на микросателитните алели.
2. Възможности за директен мултиплексен PCR (ко-амплификация на няколко локуси), когато са известни алелите на изследваните родителски генотипове - факт,

позволяващ прилагането му за анализ на сегрегиращи популации и картиране на QTLs.

Резултатите от генотипирането на доматените образци потвърждават действително ниското ниво на генетично разнообразие (GD=0.222) при тази култура. Най-ясно изразена е генетичната дистанция между ИЗК Аля и Л984 (0.3992; общо 63 полиморфизма) и между ИЗК Аля и Л1116 (0.3754; общо 55 установени полиморфизми), съответно. Сред анализираната група образци ИЗК Аля се откроява като генотип с най-високо съдържание на ликопен и със сравнително различна алелна конфигурация в анализираните локуси, дължаща се и на установените 20 уникални алели. Тези характеристики определят по-нататъшното използване на този генотип в хибридизационните програми.

Изследването е предпоставка за обстойно проучване на генетичния потенциал на колекцията от доматени образци в България. Това ще позволи елиминиране на дублирани образци, създаване на основна (core) колекция, отразяваща функционалното разнообразие, както и ефективно съхранение на генотиповете. От друга страна, прецизната оценка на генотиповете на фенотипно, биохимично и молекулярно ниво ще позволи по-ефективен мениджмънт, рационално използване на генетичните ресурси от тази култура в селекционните програми и изграждане на стратегии за създаване на сортове с повишени антиоксидантни свойства и устойчивост на различни видове стрес.

Малина

Широкото въвеждане на екстензивните земеделски практики през миналия век в Европа и света доведе до редукция на генетичното разнообразие не само при важни за изхранването на човечеството култури - житни, бобови и зеленчукови, но и при растителни култури каквито са овощните и дребноплодните. Сред последните, в миналото няколко подвида (малина, боровинка и др.) на вида *Rubus,* включващ 12 подвида също са били обект на култивиране и интензивно включване в селекционните програми. Макар, че техният основен ареал на разпространение е северното полукълбо се счита, че малината (*Rubus idaeus*) води своя произход от Турция. В североизточната част на Турция около Черноморския басейн се намират естествени хабитати на диви популации от този вид, характеризиращи се с голямо разнообразие от форми, които все още не са използвани от човека. Последните са ценен ресурс за по-нататъшно подобряване на вида *Rubus idaeus,* който е широко експлоатиран понастоящем в диетичното хранене и медицинската практика, поради силно изразените антиоксидантни свойства на плодовете.

Проведено е съвместно изследване на диви популации малина от два различни в географско отношение района в Анадола за разкриване на генетичния потенциал и разнообразие чрез маркерната система AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) - едно от първите за Турция по отношение на нейното приложение (**Публикация №6 от конкурса за „Професор”**). От използваните 40 ензим (EcoRI/MseI) / праймерни комбинации са селектирани 4, продуциращи високо полиморфни профили за оценка на генетичното разнообразие при изследваните 12 популации. Наблюдаваната висока генетична вариабилност може да бъде обяснена не само с ефективността на приложената маркерна система за нейната оценка, но и със съществуващото

разнообразие във вида, обусловено от начина на размножаване и кръстосаното опрашване. Изследването показва по-голяма генетична сходност на популациите в района на Узун дере, които заемат сравнително по-малка площ (16 км^2) и са по-близко разположени една до друга, в сравнение с тези от района на Испир, заемащи по-широк ареал и отстоящи на по-голямо разстояние помежду си (до 50 км). Проучването предоставя информация за липса на сходство между дивите популации и един от широко използваните комерсиални сортове - Heritage.

Изследването е принос не само с потвърждаване приложимостта на AFLP за оценка на генетичното разнообразие при диви популации малина, но предоставя и информация кои от тях биха могли да се включат в хибридизационните програми за създаване на нови сортове, пригодни за производство, запазвайки естествено съществуващото генетично разнообразие. То показва необходимостта от използване на тези популации за асоциативно картиране на QTLs, контролиращи важни стопански признаци и идентифициране на тези от тях, които биха били от най-голяма полза за селекционно-подобрителните програми при тази култура.

В България, изследванията при малината са насочени към проучване на генетичната вариабилност на фенотипно, ДНК и метаболомно ниво с цел цялостно охарактеризиране на наличната колекция и излъчване на генотипове с подобрени агрономически признаци в това число вкусови качества и с високо съдържание на важни за човешкото здраве компоненти. **Проучен е генетичния профил и е изследвано съдържанието на фенолни съединения в листата на 22 сорта и елитни клонове от Българската колекция с 20 SSR маркери и течна хроматография, съответно (Постер №3 от конкурса за „Професор"). Изследването показва наличие на по-голямо количество фенолни съединения в листата на сортовете и елитните клонове в сравнение с дивите видове *R. odoratus* и *R occidentalis* – факт, потвърждаващ групирането на генотиповете в дедрограмата, основана на SSR маркери.**

Проучванията са в съзвучие с Европейските насоки за подобряване качеството на живот, чрез консумиране на продукти с високо съдържание на полезни за човешкото здраве биоактивни вещества (Публикация №30 от конкурса за „Професор").

<u>Поднаправление III</u> - Характеризиране на генетични ресурси от селскостопански животни (крави, овце) ДНК маркери (SSR)

<u>Говеда</u>

Направена е оценка на генетичното разнообразие на популациите на Родопско късорого и Сиво говедо от района на Смолян и Бургас с цел установяване на вътре- и междупородната вариабилност на основата на **панел от 11 SSR маркери**, препоръчани от ISAG/FAO (International Society for Animal Genetics/Food and Agricultural Organization) за анализ на генетичното разнообразие при говеда. (**Публикация №5 от конкурса за „Професор"**). Установени са както високи нива на генетично разнообразие и (*He*=0.785 и *He*=0.775, съответно), така и сравнително високи нива на

хетерозиготност (*Ho*=0.751 и *Ho*=0.764, съответно) при двете породи. Въпреки това е налице слабо изразена тенденция към хетерозиготен дефицит (различие в стойностите на Но и Не в рамките на популацията), който е по-висок при Родопско късорого говедо, най-вероятно в резултат на инбридинг.

Представените изследвания (Публикация №5 от конкурса за „Професор" и Публикация №16 от предходна хабилитация) са първите съобщения в страната за провеждане на оценка на вътре- и междупородното разнообразие на ниво ДНК.

Двете популации могат да бъдат използвани като резервоар на ценни алели в развъдните програми. Изследванията (Публикация №4 и Доклад №18 от конкурса за „Професор") също така акцентират върху възможността на базата на получената молекулярно-генетична информация да бъде разработена селекционна програма за съставяне на случаен план и подбор на родителски двойки по най-отдалечените в генетично отношение животни, с цел избягване на инбридинга.

Поддържането на високи нива на генетично разнообразие и ниски нива на инбридинг в породите са приоритет на консервационните програми в животновъдството. Високото ниво на генетично разнообразие е и от изключителна важност за естествената или насочена селекция по признаци от икономически, исторически и социо-културен характер.

Овце

Извършено е първото всеобхватно проучване на генетичните ресурси на 7 популации от местни породи овце в България (Брезнишка, Софийска, Медно-червена шуменска, Каракачанска, Местна Карнобатска, Черноглава Плевенска и Старозагорска) на основата на микросателитен анализ (6 SSR маркери от ISAG/FAO) и е установено високо ниво на генетично разнообразие (0.78) в техния генофонд. По-високи нива на генетично разнообразие се наблюдават в Софийската, Медно-червена шуменска и Брезнишка породи в сравнение с останалите (**Публикации №23 и №19 от конкурса за „Професор"**). Установени са високи положителни стойности на коефициента на инбридинг *Fis* при анализираните популации - индикация за висок хетерозиготен дефицит в резултат на инбридинг, като тази стойност е най-висока при Софийската и Каракачанската (0.30), а най-ниска при Старозагорската порода (0.10). Генетичната диференциация между популациите е слабо изразена (*Fst*=0.06) – проблем, породен най-вероятно от липса на ясна географска диференциация на породите, сходни селекционни практики и условия на отглеждане, и на генетичен поток между тях в миналото и понастоящем. Най-ясно изразени са генетичните дистанции между Старозагорска и Местна Карнобатска породи (0.626), независимо от географската им близост, дължащи се най-вероятно на принадлежността им към два различни вида овце - Цигай и Цакел. Проведеният анализ на популационната структура със софтуера STRUCTURE, показва най-ясно изразена генетична диференциация (липса на смесване на породите) при две от анализираните 7 популации – Брезнишка и Софийска.

Независимо от малкия брой маркери, изследването предоставя ценна информация за състоянието на генетичното разнообразие, нивата на инбридинг и популационната структура на 7 от около 20 известни местни породи овце в

България. Получените данни и тяхното бъдещо обогатяване чрез прилагане на много по-голям панел от SSR маркери в комбинация със SNP чип (>50К) ще диференцира много по-ясно породите и ще разкрие важни закономерности, необходими при разработване на ръзвъдни стратегии и програми за опазване на аборигенните породи овце като културно-историческа, социално-икономическа и екологична ценност. (Доклад №18 от конкурса за „Професор")

II. Проучвания върху механизмите на толерантност към абиотичен стрес (студоустойчивост, осмотичен и солеви стрес)

1. <u>Хексаплоидна пшеница</u>

В резултат на няколкогодишни (2005-2008г.) експерименти по студоустойчивост на 10 български и 5 чужди сортове, проведени в контролирани (Aricultural Institute, Agricultutural Academy, Мартонвашар, Унгария) и полско-лабораторни (ДЗИ-Г.Тошево, ССА, България) условия са **определени като най-студоустойчиви българските сортове: Милена и Победа, чийто праг на преживяемост (LT_{50}) е сходен с този на един от най-студоустойчивите украински сортове - стандарта Мироновская 808 (Публикация №15 от конкурса за „Професор"**). Сортовете Садово 1 (използван дълги години като стандарт в България), един от най-разпространените понастоящем в производството сорт Енола и руският сорт Безостая 1 (участващ в качеството на родител при създаване на голяма част от българските сортове) заедно с Кристал, Ласка и Ранная12 формират групата на средно толерантните сортове. Към групата на сортовете с ниско ниво на толерантност се отнасят Скороспелка 35, Свилена, Русалка, стария български сорт №301 и Лозен. Необходимо е да бъде отбелязано, че българските сортове Милена и Победа както и Мироновская 808 се проявяват като най-студоустойчиви както при добро, така и при недостатъчно закаляване – явление, валидно за климатичните условия на България през есенно-зимния сезон, поради флуктуации в температурите. В качеството на показател за най-добре проявени различия в поведението на сортовете при добро закаляване е определена ниската отрицателна температура (-21ºС), а температура -18ºС - за слабо закаляване и при контролирани условия. За установяване ефектите на 5А хромозома са създадени хибриди на 3 чужди сорта с различна толерантност към измръзване: висока - Мироновская 808, средна - Ранная12 и ниска - Скороспелка 35 и техните монозомни по 5А хромозома линии със седем български сортове и Безостая 1. В теста за толерантност към измръзване са използвани семена от F2 на еуплоидните и монозомни хибриди. Ефектите на 5А хромозома са определени въз основа на достоверността на отклоненията в преживяемостта на растенията на монозомните от еуплоидните хибриди.

Резултатите показват различен ефект на хромозома 5А върху нивото на студоустойчивост в зависимост от силата на стреса и генетичния бекграунд на новосъздадените F2 хибриди. 5А хромозома и на двата най-студоустойчиви български сортове Милена и Победа показва по-силен ефект върху студоустойчивостта на F2 хибриди със сортове, притежаващи средно и ниско ниво на толерантност при двата вида

условия на закаляване - добро и недостатъчно, изразяващ се в по-добрата преживяемост на растенията. 5А хромозома на Милена има по-силен ефект от съответния хомолог в Мироновская 808 само при недостатъчно закаляване, докато тази на Победа - понижаващ ефект при същите условия.

По същество това са първите сериозни резултати по дефиниране нивото на студоустойчивост на Български сортове пшеница. Направлението „Селекция по студоустойчивост" продължава да бъде във фокуса на изследователите. Интерес представляват резултатите от проучването на студоустойчивостта при зимната обикновена пшеница в ДЗИ - Г. Тошево в периода 2008-2011 при полско-лабораторни условия (Ценов и др., 2012), които потвърждават нашите експериментални данни. **Проблемът ще продължава да бъде актуален, поради все по-драстичните климатични промени в света и в България и необходимостта новите сортове да включват комплекс от признаци, свързани с повишена толерантност към комбинации от стресови фактори.**

Усилията в това направление са продължени с проучвания върху експресията на няколко гена (Постер №13 и Доклад №14 от конкурса за „Професор"), локализирани в локус *Fr-2* (*Frost Resistance*) върху дългото рамо на 5-та хомеоложна група, чиято роля за студоустойчивостта на пшеницата е несъмнена (Baga et al., 2007; Knox et al., 2008; Galiba et al., 2009; Motomura et al., 2013). Получените от нас експериментални резултати, сочат по-силната заангажираност на локус *Fr-2* в детерминацията на нивото на толерантност на сортовете в сравнение с *Fr-1* (-A1, -B1, -D1), локализиран в близост до гените за яровизация *Vrn-1* (-1A,- 1B и -1D) в дисталния край на дългото рамо на хромозомата.

Изследвана е експресията на 4 гена, представляващи транскрипционни фактори (C- repeat Binding Factors или CBF), активиращи се в отговор на нискотемпературен стрес, каквито са и ниските положителни температури (аклимация). Тези температури са необходими за протичането на два изключително важни и припокриващи се до известна степен процеси при зимните житни култури - аклимиране и яровизация, които са от изключителна важност както за високия праг на преживяемостта им при ниски отрицателни температури през студените зимни месеци, така и за преминаването им от вегетативна в репродуктивна фаза в края на зимния сезон, обуславящо тяхната продуктивност.

Въпреки наличните данни през последните години, че клъстерираните в локус ***Fr-2*** на 5-та хомеоложна група CBF гени са част от сложна генна мрежа, отговорна за естествената вариация в нивото на толерантност към измръзване, въпросът кои от тях имат по-силен и кои адитивен ефект остава все още ненапълно изяснен. Използването на различни сортове с различна екологична адаптация и бекграунд е в основата на изясняването на този важен въпрос, стоящ на дневен ред пред научните групи, работещи по проблема студоустойчивост при пшеницата и други важни зърнени култури. Ето защо, в проведеното изследване са включени два от диференцираните от нас зимни сортове пшеница (**Публикация №15 от конкурса за „Професор")** с различно ниво на устойчивост (Милена - силно устойчив и Русалка – ниско устойчив), но с еднакво изискване за продължителност на яровизацията, редуцирайки максимално влиянието на *Vrn-1* гените върху експресията на CBF гените, както и чувствителния

пролетен сорт - Chinese Spring в качеството на контрола. Различието в механизмите на стрес толерантност е проучено чрез прилагане на нискотемпературен стрес (2°C) (аклимиране) за 7 часа.

Експресионните анализи, проведени с помощта на qRT-PCR (quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) показват по-високо ниво на експресия на 3 от изследваните 4 CBF гени гените във високо толерантния сорт Милена в сравнение със сорт Русалка и Chinese Spring. **(Постер №13 и Доклад №14 от конкурса за „Професор")**

Изследванията показват, изключително важното значение на генетичния бекграунд на сортовете и произтичащото от това участие на различни гени от CBF клъстера в регулацията на CBF регулона при пшеницата. Наблюдаваната по-бърза индукция и по-висока експресия на проучваните гени в сорт Милена в сравнение с другия зимен сорт и Chinese Spring и преди иницииране (22°C) на ниско температурен стрес (2°C) е ясен показател за различия в механизмите на регулация, което е предпоставка за различния LT_{50} капацитет на сортовете.

Горепосочените гени могат да бъдат използвани като потенциални функционални маркери за идентифициране на студоустойчиви сортове и включването им в бъдещи програми по студоустойчивост при пшеницата.

Проучванията са основа за по-нататъшно характеризиране и на други гени от CBF регулона за по-детайлно изясняване на механизмите на стрес толерантността при българските сортове пшеница на основата на генна експресия или транскриптомен анализ, използвайки най-новите постижения на втора и/или трета генерация методи за секвениране. Последните ще позволят в бъдеще генериране на нови хаплотипове, комбиниращи най-благоприятните алели на гените, „ангажирани" в изработването на защитните механизми срещу измръзване в новосъздаваните български сортове.

2. Твърда пшеница

За разлика от другите икономически важни житни култури, твърдата пшеница се отличава със сравнително по-добра сухоустойчивост, поради нейния еколого-географски произход и ареал на разпространение (най-южните части на умерения и субтропичния климатичен пояс). Очертаващата се тенденция за изменение на климата в световен и национален мащаб и в посока към глобално затопляне, и намаляване почвената и атмосферна влажност (IPCC, 1998) налагат по-детайлно изучаване на сложните механизми, контролиращи признаците, свързани с по-високо ниво на толерантност за повишаване на сухоустойчивостта и при твърдата пшеница.

В този аспект, проблемът създаване на сухоустойчиви генотипове твърда пшеница в България е от изключителна важност. Затрудненият отбор на устойчиви генотипове, поради липса на постоянно действие на стресовите фактори от една страна и недостатъчната информация относно физиолого-биохимичната, генетична и молекулярна природа на устойчивостта от друга, налагат използване на холестичен подход като първа стъпка, включващ класически генетичен метод за изучаване наследяването на полигенни признаци, морфо-физиологичен - за идентифициране на морфо-физиологични признаци, свързани със сухоустойчивостта и молекулярен –

идентифициране на ДНК маркери, свързани с признаци, експресиращи се при условия на засушаване. (**Публикация №33 и №34 от конкурса за „Професор”)**

Липсата на постоянно действащи средови стресови условия, позволяващи бърза селекция на генотипове, откроряващи се с по-висок потенциал за преодоляване негативните последици от неблагоприятните условия (засушаването) изисква използването на вторични признаци, слабо влияещи се от взаимодействието среда-генотип, но корелиращи генетично с характеристики на добива и с наличие на достатъчно фенотипно вариране при житните видове (Araus, 2008). В качеството на такива вторични признаци могат да бъдат използвани някои важни характеристики при растенията, сред които и осмотичната способност като физиологичен признак.

В проучването на генетичния потенциал на български сортове твърда пшеница да преодоляват негативните последици от водния дефицит, предизвикан от осмотичен стрес са включени 4 зимни сорта на ИПК - Чирпан, от които един стар български Апуликум 233 (А233) и една линия Д6189. **Използван е модифициран от нас, индиректен метод за измерване депресията в растежа на прорастъци (**Morgan 1988), индуцирана от прилагането на 1М р-р на глюкоза в качеството на осмотик, както на отделните генотипове, така и на растенията от F1 на проведените диалелни кръстоски между тях.

Двугодишните изпитвания на 5-те генотипа на основата на този метод показват че с най-нисък коефициент на депресия, т.е. най-добра толерантност към обезводняване на ниво прорастъци се характеризира старият български сорт А233 (21.7%), а с най-висок и съответно най-слаба толерантност - сорт Гергана (31.7%). С най-нисък коефициент на депресия се отличават хибридните комбинации с участие на най-толерантния родител А233, т.е. понасят по-добре обезводняването във фаза покълване. (Публикации №22 и №33 от конкурса за „Професор”)

Диалелният анализ за комбинативна способност (Griffing, 1956) по отношение на агрономически важни признаци, като индиректен критерий за осмотичната способност на генотиповете в рамките на 3 годишни изпитвания показва, **че унаследяването на високите нива на осморегулация се определя както от адитивни, така и от неадитивни генни ефекти, с преобладаване на неадитивните такива (специфична комбинативна способност - СКС)**. Последните имат силно влияние върху наблюдавания висок хетерозисен ефект – причина за по-нисък коефициент на депресия, т.е., за по-високи нива на осмотична регулация. **Изследването предоставя важна информация, съгласно която сред анализираните 5 генотипа твърда пшеница старият български сорт А233 се класифицира като силен общ комбинатор по признака висока осмотична регулация, а сорт Гергана - като слаб. (Постер № 4 от от конкурса за „Професор”)**

Проведените молекулярни изследвания с 40 праймерни двойки, амплифициращи 43 микросателитни (SSR) локуси, диспергирани в генома на твърдата пшеница, предоставят информация не само за генетичната конституция на всеки от анализираните 5 генотипа, но и за алелната им конфигурация във всеки локус. Въпреки ниското ниво на генетично разнообразие между толерантния по признака осмотична регулация сорт А 233 и чувствителния – сорт Гергана (GD=0.534) същите се различават

в 27 SSR локуси, от които 8 на хромозома 7A, на която са картирани голям брой QTLs за различни агрономически, физиологични признаци, метаболити и резистентност към осмотика NaCl. Клъстерните анализи въз основа на агрономическите признаци, свързани с добива и осмотичната регулация при воден дефицит и тези въз основа на генотипните данни показват корелация в групирането на генотиповете в двете дендрограми - специфично отделяне на стария сорт Апуликум 233 в самостоятелен клъстер. Проведените допълнителни анализи - Principal Component analysis (PCA) показват специфични корелации между важни агрономически и морфо-физиологични признаци при българските сортове твърда пшеница в условия на воден дефицит, някои от които могат да се използват като индикатори за добива (FIN/S - брой класчета в клас; KN/S - брой зърна в клас; KW/S - тегло на зърната в клас и TKW - тегло на 1000 зърна), какъвто е случая и с дължината на последното междувъзлие (PL) в това изследване. Установени са и релации между някои признаци и локуси, голяма част от които се намират в близост до известни вече QTLs, контролиращи важни агрономически, физиологични признаци, метаболити и др. Тези анализи показват необходимостта от картиране в бъдеще на QTLs при използване на сегрегираща популация от кръстоска между толерантния Апуликум 233 и чувствителния сорт Гергана, идентифициране на гените, контролиращи фенотипната вариабилност и мутациите в тях с оглед излъчването на алели като функционални маркери с приложение в селекцията за бърз и ефективен отбор на сухоустойчиви генотипове.

3. Ечемик

През последните години засоляването и засушаването са сред най-сериозните абиотични стресови фактори, представляващи все по-съществен проблем за съвременното земеделие, поради намаляване добивите от културните растения. Засоляването има съществено икономическо значение *(THE WORLD BANK.* Integrating Environment into Agriculture and Forestry Progress and Prospects in Eastern Europe) засягайки все повече южноевропейски страни, в това число и България. Очакванията са глобалното затопляне да увеличи опасността от вторично засоляване. В България най-проблемните засолени области са районите около Сливен, Ямбол, Бургас, Пловдив и В. Търново, обхващащи повече от 35 000 хектара (Изпълнителна агенция по околна среда - 2013; http://www.eea.government.bg/). Счита се, че в следващите години ще бъдат засегнати нови ареали, което поставя на дневен ред въпросът за преодоляването на този вид стрес. За съжаление в България се обръща изключително малко внимание на този проблем, който все повече се задълбочава, поради което се очаква в близките години да бъде един от сериозните, засягащи продоволствената сигурност. Сред основните причини за засоляването на почвите са високото ниво на минерализация на подземните води и пресушаване на влажните зони. То е основен абиотичен фактор, който влияе негативно върху физиологията и метаболизма на растенията, нарушавайки значително растежа, развитието и продуктивността им. Солевият стрес по своята същност е комплексен, а сред най-съществените му ефекти са водния и йонния дефицит.

В световен мащаб разрешаването на проблема със засоляването на почвите се базира на три основни подхода: (i) ефективни мелиоративни практики; (ii) селекция на култури с повишена толерантност и (iii) генно-инженерни манипулации. Ечемикът е култура,

съчетаваща халофитни и гликофитни свойства, поради което е подходящ модел за изучаване на механизмите, включващи се в отговор на солеви стрес (Munns и Tester 2008; Mian et al. 2011). Молекулярните и конвенционални изследвания показват, че той е важен източник на алели за повишаване толерантността на житните култури към засоляване (Colmer et al. 2006; Munns et al. 2006). Ключова предпоставка за решаване на проблема солеви стрес е наличието на генетично разнообразие в колекцията от ечемик в България – факт, позволяващ селекция на български сортове ечемик с повишена толерантност към солеви стрес и отглеждането им в засегнатите ареали.

Основна цел на инициираните изследвания (**Публикация №28 и №24 от конкурса за „Професор”)** е да се проучат механизмите на толерантност към солеви стрес при ечемика чрез прилагане на мултидисциплинарен подход. Комбинацията от морфологични, физиологични, биохимични, ензимологични и метаболитни анализи цели селекция на икономически важни български сортове ечемик с повишена толерантност, идентифициране на биомаркери с приложение в селекцията на стрес толерантни генотипове; създаване на обобщаващ модел за изучаване механизмите на толерантност на житните култури към засоляване и дефиниране на нови стратегии и подходи за по-добро използване на наличното генетично разнообразие за повишаване на толерантността към засоляване.

За провеждане на изследванията са селектирани 12 съвременни двуредни и 4 многоредни сортове от колекцията на ИЗ – Карнобат. В настоящето проучване **(Публикации №28 и №24 от конкурса за „Професор”)** е използван мултидисциплинарен подход – физиологични, биохимични и молекулярни анализи за идентифициране на толерантни на солеви стрес многоредни сортове ечемик – ИЗБори, Божин, Веслец и Ахелой2.

Проучена е фотосинтетичната активност и стабилността на мембраните на многоредните сортове ечемик на стадий 3-ти лист, подложени на солеви стрес (250мМ NaCl) за период от 10 дни чрез измерване на хлорофилната флуоресценция (чувствителен индикатор за фотохимичните процеси и функционалното състояние на фотосистема II), относителното водно съдържание (RWC) и електролитното изтичане.

Резултатите от хлорофилната флуоресценция показват стабилност на фотосинтетичния апарат (фотосистема II – PSII) и при 4-те сорта. Само няколко параметъра – Rfd (индекс на намаление на флуоресценцията) и LnU (количеството енергия, която не се използва за фотохимични реакции) и нефотохимично гасене (NPQ) показват вариация между сортовете. Същата зависи от продължителността на стреса и има генотипна зависимост. Фотоинхибиция, макар и не толкова съществена се наблюдава при сортове Ахелой 2 и Веслец. За разлика от флорофилната флуоресценция и RWC, които са недостатъчно чувствителни параметри при приложеното ниво на стресово въздействие (250mM NaCl), електролитното изтичане от тъканите е добър критерий за диференциране на многоредните сортове ечемик. Получените резултати показват, че след приложения солеви стрес растителните клетки са в състояние на окислителен стрес, чието продължително действие (10 дни) води до деструкция на клетъчните мембрани. Най-ясно изразено нарастване на индекса на повредите на клетъчните мембрани (I%) се наблюдава при сорт Веслец, следван от Божин и Ахелой2,

а най-малко - при ИЗБори. Този параметър е показателен за по-високото ниво на толерантност на сорт ИЗБори.

Анализирани са електрофоретичните профили на няколко от ензимите, активиращи се в резултат на оксидативен стрес (glutathione reductase (GR), catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) и ascorbate peroxidase (APX)) предизвикан от засоляването при покълнеци на толерантния сорт ИЗБори и по-чувствителния Божин, подложени на различни по сила стресови въздействия (150мМ и 300мМ NaCl). По-значителни промени в активността на ензимната система както в корени (повишаване на експресията), така и в листа (намаляване) в отговор на оксидативния стрес е отчетена за някои изоформи на пероксидазата (POX) и супероксид дисмутазата (SOD) при по-голяма сила на стреса. Наблюдавано е повишаване на експресията на SOD изоформа с мол. тегло 37kD само в корени на ИЗБори, докато 2 SOD изоформи (40kD и 70kD) показват увеличение на активността си в листа от по-чувствителния сорт Божин, което е индикация, че различни изоформи на изследваните ензими са асоциирани с толерантността и по-доброто преживяване на стресовите въздействия.

Молекулярните анализи при използване на 17 SSR маркери показват групиране на 4-те многоредни сортове в съответствие с резултатите от физиологичните изследвания.

Получените резултати са отправна точка за излъчване на специфични физиологични, биохимични и молекулярни маркери с приложение в по-нататъшните изследвания, насочени към дешифриране на сложните механизми на солевата стрес устойчивост при ечемика и идентифициране на генотипове с повишена толерантност.

4. Селекция, основана на маркери(MAS) – възможности за приложение

Основно изискване относно приложимостта на MAS за бърз и акуратен отбор на генотипове със значими за селекцията признаци е наличието на ясно изразена асоциация на молекулните маркери с QTL.

За установяване на възможността за приложение на вече установени маркери свързани с QTL за стабилност на мембраната върху 7AS хромозома при зимна хексаплоидна пшеница (Ciuca et al., 2009) е проведено генотипиране с 2 SSR маркери (*wmc603* и *Barc108*), ограничаващи идентифицираният QTL в колекция, включваща линии, получени от кръстоски с толерантния румънски сорт Извор, няколко румънски и български сортове и линии хексаплоидна и твърда пшеница (**Публикация №9 от конкурса за „Професор”**). Проведеният анализ показва, че алели специфични за толерантния сорт Извор, определящи по-високата стабилност на клетъчните му мембрани в условия на стрес – воден дефицит се откриват само в линии, получени от кръстоски, включващи този сорт. Тези алели не се установяват в останалите Румънски и Български сортове и линии.

Получените резултати са показателни, за необходимостта от допълнително насищане на района, в който е открит QTL с нови маркери и използване на по-голяма популация от DH линии (>150 линии) за постигане на по-висока резолюция и съответно по-прецизно локализиране и идентифициране на тясно скачените с него маркери.

От друга страна, проведените от Yonnes (2009) изследвания върху алжирски сортове пшеница, характеризиращи се с повишена толерантност на засушаване и с

електрофоретичен профил сходен с този на сорт Извор, демонстрират различни алели в локусите *wmc603* и *Barc108* върху 7AS хромозома – индикация за възможно участие и на други алели в детерминацията на по-високата толерантност към засушаване.

III. Биотехнологични подходи – методи за ин витро култивиране и генетично подобряване

Пипер

Ин витро антерните култури са в основата на създаване на хаплоидни и дихаплоидни (DH) линии с широко приложение в селекционните програми за получаване на чисти линии и в молекулярната биология за картиране на количествени признаци (QTLs). Установено е, че андрогенният отговор зависи от редица фактори: растежни регулатори, условия на култивиране, среди и др. и не на последно място от генетичния потенциал на сорта или линията.

В този аспект е изпитано влиянието на факторите: композиция на средата и продължителност на култивиране върху *ин витро* отговора на антерни култури от 19 генотипа български пипер (*Capsicum annuum* L.) (**Публикация №13 от конкурса за „Професор”)**. Анализите показват, че 6 сорта, 6 линии и 3 хибрида продуцират директно ембрия 35-40 дни след инокулиране. Констатирано е, че по-дългото култивиране (40 дни) на индукционна среда С и последващото прехвърляне на ембрията на регенерационна среда R, води до получаване на най-много регенеранти. Такива са получени от 4 линии, 6 сорта и един хибрид.

Установено е, че донорните генотипове имат специфични изисквания към средата и времето на култивиране за разкриване на ембриогенния им потенциал. Показано е, че комбинацията от индукционна и регенерационна среда и продължителността на култивиране върху индукционна среда са от изключителна важност за индуциране на ембриоиди и регенерирането им до цели растения.

Приложената процедура може да бъде използвана за разкриване ембриогенния потенциал на линии, сортове и хибриди пипер (*Capsicum annuum* L.) с ценни икономически признаци с оглед използването им като бъдещи успешни донори за получаване на дихаплоидни линии.

Овощни видове - Слива

Един от основните проблеми при овощните костилкови видове в България и в света е редуциране на добивите и качеството на плодовете поради зарази, причинявани от силно агресивния вирус по шарката (*Plum Pox Virus* – PPV). Контролът върху разпространението му е изключително труден и не винаги ефективен поради преносът му с инфектиран посадъчен материал и от листни въшки (вектори на вируса) по неперсистентен начин. В резултат на ендемичното разпространение на болестта, обширни области с костилкови овощни видове в редица страни от централна Европа и Балканския полуостров са изкоренени/или подлежат на унищожаване, което е свързано с огромни социално-икономически загуби. Сред подходите за ограничаване на разпространението му и намаляване на добивите сред овощните видове е отглеждане на

насаждения от устойчиви сортове. В селекционната практика са известни два начина за отбор на такива сортове – естествен, който включва селекция на сортове, показващи естествена устойчивост и такива, чиято резистентност е повишена чрез биотехнологични подходи.

Фактът, че в последните десетилетия броят на чувствителните към този вирус комерсиални сортове непрекъснато расте, налага използване на биотехнологични подходи за редуциране на това икономически важно вирусно заболяване и повишаване на добивите. В колаборация с италиански колеги са разработени регенерационни протоколи от листен материал и зрели зародиши (семена) от няколко сорта сливи. Чрез трансформация на хипокотили от семена с *Agrobacterium tumefaciens*, съдържащ плазмид, носещ ген за обвивката на вируса (*PPV* coat protein) са получени 8 и 3 трансгенни клонове, съответно от сортове 'Stanley' и 'St. Julien'. Интегрирането на гена за *PPV* coat protein в генома на получените трансгенни растения е доказано с молекулярни анализи (PCR). Проведените заразявания на трансгенните растения и последващите анализи с DAS – ELISA не показаха симптоми на заразяване с вируса. **(Публикация №2 от конкурса за „Професор") Изследванията са предпоставка за по-нататъшно проучване на механизмите на резистентност чрез метода *RNA-interference* и потвърждават приложимостта на генетичните манипулации в случаите на трудности при естествената селекция на резистентни сортове от овощни видове.**

IV. Изолиране на гени

Изолирането на гени от растителни и животински видове има за цел не само обогатяване на световната бази данни с нови гени и ESTs, но и проучване тяхната структура и функция, водещо до разширяване на познанията ни относно еволюцията, структурата и динамиката на геномите, ролята им в отговора към абиотичен и биотичен стрес и екологичната пластичност на организмите.

Ечемик

Изолиран е ген **Hvdr4** (**JF796131.1**) с дължина 1960бд, представен от 3 екзона и 3 интрона от културен вид ечемик (сорт Себастиян), кодиращ dehydration responsive protein 4" с дължина 250АК, включващ се в отговора на воден дефицит. Генът е хомоложен на Hsdr4 (*Hordeum spontaneum* dehydration – responsive), кодиращ протеин сходен с Rho-GTPase protein–like от ориз, притежаващ Sec14 p-подобен липид-свързващ домен.

Предстои секвениране на промоторната част на гена от няколко толерантни и чувствителни към воден дефицит и засоляване български сортове ечемик за изясняване ролята му в експресията в условия на стрес.

Рапан

Изолирана е **кДНК** (**KF410817.1**) на ген, кодиращ актин (*RvAct1*) на основата на RT-PCR, 3` и 5`RACE подход от вида *Rapana venosa,* обитаващ Черноморския басейн. кДНК е с дължина 1565бд и включва 111бд и 326бд 5'и 3' нетранслируеми райони,

съответно. Отворената рамка на четене на гена кодира полипептид с дължина 376АК. Сравнителният анализ показва, че *RvAct1* е по-скоро сходен с немускулния тип актини (β- или цитоплазмени), отколкото с мускулните α-актини. **Изолираната кДНК представлява не само нова информация за функционалното разнообразие от актини в клас *Gastropoda,* но позволява и използването на гена като отправна точка за бъдещи експресионни анализи при този вид.**

Раци

Изолирани са два 5' хемоцианинови транкрипти от рака *Eriphia verrucosa*, обитаващ Черноморския басейн (**Публикация №26 от конкурса за „Професор")** използвайки 5'/3'RACE кит и ген-специфични праймери, съответстващи на вътрешната секвенция на гена за хемоцианин, изолирана в предходно изследване (**Публикация № 3 от Списъка на публикациите извън настоящия конкурс и предходна хабилитация**). Транскриптите (EvT1 и EvT2) кодират полипептиди с дължини - 111АК и 112АК, съответно. Сравнителният анализ показва, че и двата полипептида включват част от домен N (***Hemocyanin_N***), специфичен за N -терминалния край на артроподните хемоцианини и запасните протеини на стадий ларва при насекомите. Различието между полипептиди EvT1 и EvT2 се изразява в липса на 1 АК остатък на 2-ра позиция и 8 АК замени в EvT1. Полипептид EvT1 показва малко по-голяма хомология с дефинираните Hc субединици 4, 5 и 6 на американския син рак *Cancer magister*. Филогенетичният анализ, групира EvT1 и EvT2 полипептиди с тези, изолирани от артроподи от подклас *Brahiura*, към който спадат и *E. verrucosa* и *Cancer magister*.

Изолирането на Hc транскрипти е начална стъпка в идентифицирането и характеризирането на гените, кодиращи отделните субединици, изграждащи сложната Hc молекула. Определянето на районите с антивирусна, антибактериална и антитуморна активност ще позволи по-ефективното използване на Hc пептиди в медицината и фармацията.

V. Други научно - приложни приноси

Публикувани са редица обзорни статии в списания и книги, засягащи важни проблеми в областта на:

- абиотичния и биотичен стрес при житни култури (хекса – и тетраплоидна пшеница, царевица) (**Публикации №31, №32, №33 и №34 от конкурса за „Професор");**
- видове мобилни елементи и по-специално ретротранспозони и ролята им за еволюцията на растенията (**Публикация № 29 от конкурса за „Професор");**
- значение на биоактивните вещества в дребните плодове (ягоди, малини, къпини, боровинки и др.) за човешкото здраве и технологии за тяхното анализиране (**Публикация № 30 от конкурса за „Професор")**
- възможностите на съвременните технологии, в това число и на молекулярната биология и биотехнологиите за решаване на важни проблеми на съвременната селекция за по-високи добиви и по-добро качество на растителните и животински продукти (**Публикация № 35 от конкурса за „Професор")**

- разпространение и идентификация на силно (Al subtype H5N1) и по-слабо патогенни птичи грипни щамове (Al subtype H4, H5, H6 H7 и H10) в различни видове диви и домашни птици и различни ареали в България – необходимост от мониторинг за предотвратяване на разпространение на патогенните за птиците и човека грипни щамове (**Публикация № 36 от конкурса за „Професор”)**
- разработване и използване на различни софтуерни решения за обработка и систематизиране на биологични данни и огромни масиви от NGS секвенции с приложение в растителната, животинска и медицинска геномика (**Публикации №37 и №38 от конкурса за „Професор”);**
- възможности на съвременното земеделие за постигане на продоволствена сигурност при непрекъснато променящите се климатични условия – проблеми и перспективи пред човечеството в следващите 50 години (**Публикация № 39 от конкурса за „Професор”);**
- преглед на основните маркерни системи, използвани в животновъдството за решаване на важни проблеми, свързани с разработването на стратегия за устойчиво развитие на животновъдния сектор в България в съответствие с Европейските директиви за опазване на генетичните ресурси и повишаване качеството на продуктите в животновъдството (**Публикация № 40 от конкурса за „Професор”)**

ПРИНОСИ ПО УТВЪРЖДАВАНЕ И РАЗВИТИЕ НА НАУЧНО-ТЕМАТИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ НА ГРУПА „ФУНКЦИОНАЛНА ГЕНЕТИКА ЖИТНИ” ПРИ АГРОБИОИНСТИТУТ

Съществена част от научно-изследователската ми работа след 2004г. е свързана с разширяване насоките на научно-изследователската дейност и капацитета на ръководената от мен група „Функционална генетика житни” при АгроБиоИнститут. В периода 1999-2003г след създаване на групата, основното направление на експериментална работа е подобряване на житните култури чрез генетична трансформация. Макар, че това направление бе запазено през следващите 3 години до 2008г. и бе основа на 2 успешно защитени дисертации през 2006г., в началото на 2004г., когато поех ръководството на групата експерименталната й работа бе значително разширена чрез въвеждане на нови методи, подходи и изследвания в области, включващи:

1. Молекулни маркери за изследване на генетичното разнообразие и агро-екологичната адаптация при житни и др. икономически важни култури и селскостопански животни;
2. Проучвания върху молекулярните механизми на различни видове абиотичен стрес при житни култури чрез генна експресия;
3. Картиране на QTLs за важни признаци, експресиращи се в условия на различни нива на минерално хранене и воден дефицит и такива, свързани с различни нива на

антиоксидантна активност;

4. Разработване на алел-специфични маркери на основата на секвениране на гени/геноми на някои важни сортове и линии житни и др. растителни култури и животни;

5. Изолиране на гени от различни видове организми и тяхното охарактеризиране, с оглед ефективно използване на кодираните от тях белтъци в медицинската практика, фармацията и др.

Тези нови направления са обект на изследвания в 10 дисертационни трудове (7 успешно защитени в периода 2006г. - 2015г., 2 пред защита и 1 в процес на разработка) и 7 защитени дипломни работи.

В процес на въвеждане и разработване са изследвания на метаболома и протеома на житните култури в отговор на различни видове стрес с цел сравнително по-комплексна оценка на генетичния потенциал на българските сортове и линии в отговор на неблагоприятните климатични условия.

Разширяването на научно-изследователската дейност и повишаването на научния капацитет на групата са основа за прилагане на комплексни подходи – геномни, метаболомни и протеомни при решаване на важни проблеми, свързани с добивите и качеството на продукцията от житни култури при непрекъснато променящите се условия на средата; изолиране и охарактеризиране на гени, кодиращи важни за човешкото здраве белтъци и др. Те са и ще бъдат основа за по-висока конкурентна способност на група ”Функционална генетика Житни”, АгроБиоИнститут при участие в национални и международни проекти и решаване на важни за селското стопанство и човешкото здраве задачи.

15.10.2015 г.
София

/Доц. д-р Елена Г. Тодоровска/