

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ  
АГРОБИОИНСТИТУТ - СОФИЯ

Стефан Василев Цонев

Приложение на ДНК маркери за картиране на локуси, контролиращи  
добива на царевицата (*Zea mays*) в условия на воден дефицит и  
различни нива на азотно хранене

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертационен труд  
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”  
по научна специалност „Генетика”  
шифър 01.06.06

научен ръководител:

Доц. д-р Николай Христов

София,

2015 г

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита след предварително обсъждане на разширено заседание на Първичното Научно Звено на АгроБиоИнститут, проведено на 28.01.2015 г.

Дисертационният труд се състои от 128 страници и съдържа 21 таблици и 16 фигури. Цитирани са 172 литературни източника.

Научно жури:

доц. д-р Красимир Русанов

доц. д-р Николай Христов

проф. д-р. Севдалин Георгиев

проф. д-р Спаска Петкова

доц. д-р Стефан Вълчинков

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... 2015 г. От .... часа на открито заседание на Научно жури, избрано от Научния съвет на АгроБиоИнститут с Протокол No / ..... г. и утвърдено със Заповед No.../..... г. на Директора на АгроБиоИнститут.

За създаването на тази дисертация искам да изкажа искрени благодарности на:

- Моята майка, Димитрина Цонева, за подкрепата през целия ми житейски път;
- Научният ми ръководител, доц. д-р Николай Христов, за доверието;
- доц. д-р Елена Тодоровска за напътствията през целия период на работата;
- доц. д-р Вилиана Василева и доц. д-р Емил Василев (ИФК – Плевен) за огромната помощ, оказана при провеждане на полските експерименти и събирането на фенотипните данни;
- д-р Мирослав Зорич ( Нови Сад – Сърбия) за неопценимата помощ при статистическата обработка на данните и предоставеният софтуер;
- доц. д-р Димитър Василев за съветите и насърченията в трудни моменти;
- Европейската Комисия за финансирането на проект NUE-CROPS FP7-CP-IP 222645, в рамки на който беше извършена работата по настоящия дисертационен труд, а така също и на МОН на Р. България за съфинансирало работата по проект ДКОФ7РП02/6;
- На екипът на Агробιοинститут - София
- И всички останали, които не са споменати, но са ми помогнали по различни начини.

## УВОД

Годишно на планетата се използват над 100 милиона тона азотни торове, чието количество нараства ежегодно и се очаква през 2015 да достигне 112.9 мил тона (FAO 2011). Високата енергоемкост на процеса на производство на азотни торове и използването фосилни горива като суровина повишават цената на торовете и земеделската продукция, от една страна, и въглеродният отпечатък на съвременното земеделие, от друга. Повисоките добиви, получавани с използването на изкуствени торове, компенсират разходите на земеделските производители, но не и щетите нанасяни върху околната среда. Екологичните проблеми свързани с все по-широкото използване на азотни торове, не се ограничават с високият им въглероден отпечатък. Голяма част от азота внесен в почвата не се усвоява от културите, а се метаболизира от почвените микроорганизми или се губи, обогатявайки околната среда на азотни съединения (Robertson and Vitousek 2009). Натрупването на реактивни азотни радикали в крайбрежните води е причина за формиране на т.нар. "мъртва зона" в мексиканския залив, простираща се на 20 700 km<sup>2</sup> (Rabalais, Turner, and Wiseman 2002). Освен предпоставка за евтрофикация и хипоксия във водните басейни, антропогенните азотни замърсявания се свързват с парниковия ефект (Foster et al. 2007), подкиселяване на почвите (Bobbink, Hornung, and Roelofs 1998) и не на последно място с риск за човешкото здраве (Powlson et al. 2008).

Raun and Johnson (1999) проучват ефективността на използване на азота (NUE) при житни култури и установяват в световен мащаб средна ефективност от 33%, изчислена като ([количеството азот в семената] - [наличното в почвата + отложеното от дъждовете])/ [количеството внесено под формата на торове]. Според авторите, ако ефективността на използване на азота се увеличи с 20%, това би довело до спестяване на 4.7 милиарда долара годишно от икономия на азотни торове. Гореизложените факти наред със задълбочаващите се екологични проблеми налагат повишаване ефективността на използване на азота (nitrogen use efficiency, NUE) при житните култури. То може да бъде постигнато по два начина, чрез въвеждане на нови агрономически практики използващи по-малки количества минерални торове или чрез селекция на сортове способни да усвояват наличния в почвата азот по-ефективно да усвояват и използват наличния в почвата азот.

Въпреки сериозните постижения на класическата селекция през последните десетилетия процесът на отбор и внедряване на подобрени линии и сортове отнема повече от десет години. Този факт, наред с бързо променящите се климатични условия предизвикани в голяма степен от нарастването на потреблението на фосилни горива и други нефтени деривати изисква промяна в цялостната политика, целяща внедряване на устойчиви практики в земеделието, осигуряващи минимално въздействие върху околната среда.

Интегрирането на молекулните маркери в изучаването на генетичното разнообразие на царевицата и използването му за целите на селекцията, доведе до натрупване на голям обем от информация за генетични локуси (quantitative trait loci, QTL) показващи асоциация с количествено унаследявани признаци при различни стресови условия. Въпреки това, практическата им приложимост остава доста ограничена - основно поради на липсата на експресия на голяма част от известните QTL-и при интегрирането им в други и сортове и линии. Това явление може да се дължи на епистатични взаимодействия или на вече налични по-благоприятни алели в генома на реципиента. Една от причините за ниската преносимост на QTL-ите се дължи на факта, че при голяма част от публикуваните QTL изследвания е използвана неелитна генетична плазма с цел по-контрастна изява на

наблюдаваните признаци. За целите на селекцията е необходимо разработване на картиращи популации при кръстосване на елитни инбредни линии, което би намалило шанса за интрогресия на неблагоприятни алели или такива с по-ниска стойност от вече наличните в плазмата обект на селекция. Ето защо настоящото изследване е проведено с картираща популация създадена с цел да се избегнат описаните ограничения.

Популацията е създадена чрез кръстосване на елитната американска инбредна линия царевица (B37) със XM87-136 получена чрез Химически Мутагенезис /ХМ/ от изходната американска инбредна линия B37 и последваща Рекурентна Реципрочна Мутационна Селекция /PPMC/ в ИЦ – гр. Кнежа (Christov et al. 2014). Известно е, че мутантната инбредна линия XM87-136 има по-висока стресоустойчивост от изходната американска инбредна линия. B37 е създадена в царевичния пояс на САЩ от Супер Стиф Столк Синтетик (SSS) със класическа Рекурентна Реципрочна Селекция (Христов 1984). Известно е, че царевичният пояс на САЩ се отличава със значително по високо ниво на влагообезпеченост на царевицата в сравнение с континенталния климат характерен за Дунавската равнина и Кнежа, където е създадена мутантната инбредна линия XM87-136.

## Цел и задачи

**Цел:** Целта на дисертационния труд е картиране на геномни локуси контролиращи добива зърно и свързаните с него фенотипни признаци в дихаплоидна популация царевица при контрастни нива на азотна и водна запасеност на почвата.

### Задачи:

- 1) Дизайн на полски експерименти и снемане на фенотипни данни за добива и свързаните с него вторични фенотипни признаци на тесткросни хибриди на дихаплоидна популация с тестер Mo17.
- 2) Статистически анализ за определяне на компонентите на варианса на изследваните фенотипни признаци.
- 3) Оптимизиране на мултиплексен PCR метод за паралелно генотипиране на SSR и IDP маркери на капиларен секвенатор, и генотипиране на дихаплоидната популация с молекулярни маркери (SSR, IDP и TD-AFLP)
- 4) Конструиране на генетична карта въз основа на рекомбинационните честоти на използваните маркери
- 5) Картиране на геномни локуси за количествени признаци (QTL), контролиращи варирането на добива зърно и свързаните с него вторични фенотипни признаци в популацията от дихаплоидни линии

## Материали и методи

### ○ Растителен материал

В полските експерименти са използвани 192 тесткросни хибрида на дихаплоидни линии от картиращата популация с Mo17.

За изолиране на геномна ДНК са използвани листа от дихаплоидните линии *per se*, отглеждани в оранжерийни условия

- Изолиране на геномна ДНК

Листният материал за екстракцията е събиран от растения във фаза на развитие трети лист. За екстракцията е използван модифициран CTAB протокол (Doyle 1990).

- Генотипиране на индивидите от картиращата популацията

Генотипирането на индивидите от картиращата популация е осъществено с помощта на три класа молекулни маркери – SSR, IDP и TD-AFLP.

За амплифициране на SSR и IDP локусите е оптимизиран мултиплекс PCR протокол, позволяващ едновременна амплификация на двата класа маркери в една и съща реакция.

- Конструирание на генетична карта

За конструирание на генетичната карта са използвани 67 SSR, 17 IDP, 33 MITE-AFLP маркера и 79 SNP локуса, генотипирани от фирма KWS. Картата е съставена на базата на рекомбинационните честоти на маркерите наблюдавани при 143 индивида от популацията. Картата е конструирана с помощта на софтуерен пакет QTL IciMapping-4.0 (Li et al., 2007), използвайки “Халдейн” функция.

- Дизайн и провеждане на полски експеримент

Полските експерименти са проведени през 2010 г. и 2011 г. в две локации – Горни Дъбник и Садово. Експериментите в Горни Дъбник включват четири третирания, комбиниращи две нива на азотно торене с два режима на напояване: висок азот поливно (ВАП), висок азот неполивно (ВАН), нисък азот поливно (НАП) и нисък азот неполивно (НАН). В Садово експериментът е проведен само с контрастни нива на азотно торене – ВАН и НАН.

В двете локации експериментите са проведени в алфа (0,1) латис дизайн (alpha lattice design) в две повторения с експериментални парцелки от един ред, всяка засята с един от изследваните генотипове. Редовете са с дължина от 5 m със 70 cm междуредие.

Фенотипните данни са снети индивидуално за всички парцелки. Дните до изсвляването (ДИ) са определени спрямо интервала между засяването и дата на изсвляване на 50% от растенията от съответната експериментална парцелка. Дните до цъфтежа на метлицата е броя на дните между засяването и цъфтежа на метлицата на 50% от растенията в съответната парцелка. Височината на растенията е измерена от земята до първото разклонение на метлицата една седмица след прецъфтяване на метлиците. Височината на залагане на кочана е измерена от основата на растението до основата (възела) на залагане на кочана. Влагата при прибиране е измерена на средна проба от ороненото зърно отделно за всяка парцелка. Общият добив на парцелка е измерен с електронна везна и превърнат в добив зърно (ДЗ) t/ha коригиран за 15% влага на зърното. Теглото на хиляда зърна е изчислено от средната маса на две проби от по 100 зърна и коригирано за влажност на зърното от 15 %.

- Статистическа обработка на данните

Общата статистика за третиранията в отделните среди е направена с помощта на функция “describeBy” от пакет “psych” R-cran. Разпределението на данните е визуализирано с помощта на пакета “boxplot” R-cran.

Асоциативните връзки между контролираните продуктивни признаци са оценени с помощта на корелации по Пийърсън с използване на вече стандартизираните данни. Корелационните оценки са получени с функция “rcorr” от пакет “Hmisc” R-cran. Стандартизирането на данните е направено посредством функция “scale” R-

cran.

За оценка на варирането на контролираните признаци и влиянието на регистрираните в експеримента генетични и негенетични ефекти е използван метода REML (Residual (reduced, restricted) Maximum Likelihood) – Остатъчното (редуцирано, ограничено) Максимално Правдоподобие.

За анализа данните от експериментите в Горни Дъбник е използван следният смесен модел:

$$Y_{ijklm} = \mu + g_k + r_i + (b:r)_{ij} + n_l + w_m + (gn)_{kl} + (gw)_{km} + (nw)_{lm} + \varepsilon_{ijklm}$$

Където,  $Y_{ijklm}$  е векторът на наблюдаваните признаци,  $r_i$  е фиксираният ефект на повторението,  $b_j : r_i$  е фиксираният гнездови ефект на блока в повторението,  $n_l$  е фиксираният ефект на азотното торене,  $w_m$  е фиксираният ефект на напоителния режим,  $g_k$  е случайният ефект на генотипа,  $(gn)_{kl}$  е случайният ефект на взаимодействието генотип с ниво на азота,  $(gw)_{km}$  е случайният ефект на взаимодействието генотип с режим на напояване,  $(nw)_{lm}$  е случайният ефект на взаимодействието ниво на азота с режим на напояване,  $\varepsilon_{ijklm}$  е случайната грешка на модела -  $\varepsilon \text{ NID}(0, \sigma^2)$

При анализа на източниците на вариране в среди Садово 2010 (C10) и Садово 2011 (C11) е използван следният модел

$$Y_{ijkl} = \mu + g_k + r_i + (b:r)_{ij} + n_l + (gn)_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Където,  $Y_{ijkl}$  е векторът на наблюдаваните признаци,  $\mu$  е средната стойност на признака за средата,  $r_i$  е фиксираният ефект на повторението,  $b_j : r_i$  е фиксираният гнездови ефект на блока в повторението,  $n_l$  е фиксираният ефект на азотното торене,  $g_k$  е случайният ефект на генотипа,  $(gn)_{kl}$  е случайният ефект на взаимодействието генотип с ниво на азота,  $\varepsilon_{ijklm}$  е случайната грешка на модела.

#### ○ Анализ на QTL и QTL x E

QTL анализът е осъществен с BLUP оценките за генотиповете, получени при анализа на вариансовите компоненти. За нормализация на данните от BLUP оценките чрез ранк трансформация е използвана функцията “rnttransform” от библиотека “GenABEL” - R-cran. Картирането на количествените локуси е извършено по метода на Обхващащ Композитен Интервал (ICIM, Inclusive Composite Interval Mapping) със софтуерен пакет QTL IciMapping-4.0 (Li et al. 2007). При анализа е използвана сканираща стъпка от 1 cM за детекция на QTL и 5 cM за епистатичните взаимодействия. Определеният прагов LOD за детекция на QTL е 2,5.

## Резултати и обсъждане

### 1. Анализ на добива и свързаните с него фенотипни признаци в тесткросни хибриди на дихаплоидна картираща популация при различни нива на азотно торене и водна запасеност

Тесткросните хибриди на индивидите от картиращата популация са фенотипирани в четири полски експеримента. Те са проведени в две локации – в землището на с. Горни Дъбник (ГД) и ИРГР–гр. Садово, в рамките на две последователни години – 2010 г. и 2011 г. В с. Горни Дъбник, експерименталният дизайн включва комбинация от високо и ниско ниво на азотно торене с два режима на напояване. В Садово експериментите са проведени само при различни нива на азотно торене.

През 2010 г. в Горни Дъбник е отчетен среден добив зърно от 8.4 t/ha общо за всички третириания (Таблица 1). Добивите наблюдавани в четирите третириания варират между 5.5 и 11.7 t/ha. Засушаването през лятото на 2010 г. оказва умерен ефект върху добива. В експеримента с главен фактор воден дефицит (ВАН) той намалява

само с 18%, докато в двете третириания с ниски нива на азотно торене редуцирането е с 44% (НАН) и 53% (НАП) спрямо контролното третиране (ВАП). Средният добив отчетен през същата година в Садово е 6.3 t/ha. Той е по-нисък от този за съответните третириания в ГД, но разликата между двете третириания е по-малка в сравнение с тази между същите в ГД. По-малката разлика вероятно се дължи на по-високо остатъчно количество азот в почвата при нетореното третиране.

В следствие на по-сухото лято на 2011 г. и намаляването на запасеният азот в почвата, в Горни Дъбник средният добив е по-нисък (6.92 t/ha) в сравнение с предходната 2010 г. В неполивният експеримент при високи нива на азотно торене (ВАН) добивът намалява с 31% в сравнение с контролния експеримент (ВАП). В следствие на изчерпване на наличното в почвата остатъчно количество азот, ефекта на азотния дефицит през този сезон е по-силен от предходния. В двете третириания НАН и НАП са отчетени добиви съответно с 69.5 и 66% по ниски от този в контролата. В Садово през 2011 г. в следствие на силното засушаване (40 дена без дъждове през Май-Юни, 2011), добивите са намалени между 77 и 87 %, поради което тази среда е изключена от по-нататъшния статистически анализ (резултатите не са показани).

Таблица 5-1. Описателна статистика на данните за добив зърно (ДЗ)

|      | Третиране | средно | мин  | макс  | размах | асиметр. | ексцес | сг   |
|------|-----------|--------|------|-------|--------|----------|--------|------|
| ГД10 | ВАН       | 9,6    | 2,62 | 14,4  | 11,78  | -0,38    | 0,39   | 0,1  |
|      | ВАП       | 11,72  | 2,66 | 17,99 | 15,34  | -0,72    | 1,16   | 0,11 |
|      | НАН       | 6,57   | 1,08 | 11,68 | 10,6   | -0,08    | -0,08  | 0,09 |
|      | НАП       | 5,52   | 1,55 | 9,46  | 7,91   | 0,08     | 0,38   | 0,06 |
| ГД11 | ВАН       | 8,17   | 0,1  | 11,93 | 11,83  | -1,02    | 2,99   | 0,08 |
|      | ВАП       | 11,92  | 0,85 | 16,88 | 16,03  | -1,49    | 4,82   | 0,1  |
|      | НАН       | 3,64   | 0,82 | 8,38  | 7,56   | 0,47     | 1,03   | 0,06 |
|      | НАП       | 3,96   | 0,83 | 8,11  | 7,28   | 0,55     | 0,48   | 0,06 |
| С10  | ВАН       | 6,79   | 2,33 | 12,4  | 10,07  | -0,01    | -0,13  | 0,09 |
|      | НАН       | 5,85   | 0,86 | 12,37 | 11,51  | 0,05     | 0,25   | 0,08 |

В Горни Дъбник през 2010 г. средният брой дни до цъфтежа на метлицата е 75. Признакът ДЦМ варира в четирите третириания между 73 - 76 дни, нараствайки с увеличаване на броя на стресовите фактори (Таблица. 2). В Садово през същата година ефекта на азотния дефицит не води до сериозно закъснение на цъфтежа на метлицата в стресовото третиране. През 2011 г. средният период до цъфтежа на мъжкото съцветие е с три дни по-кратък от този за предходния сезон но тенденцията за удължаване на периода при нарастване интензивността на стреса се запазва. През този сезон е наблюдавано удължаване на времето до изсвлячане, а от там и на интервала между съзряването на двете съцветия, което се дължи на по-силен ефект на стресовите фактори.

Таблица 2 – Описателна статистика на данните за дни до цъфтежа на метлицата и дни до изсвлячане

|                           | Третиране | средно | мин | макс | размах | асиметр. | ексцес | s.e. |
|---------------------------|-----------|--------|-----|------|--------|----------|--------|------|
| цъфтеж на метлицата (дни) | ВАН       | 74,86  | 71  | 84   | 13     | 0,82     | 2,4    | 0,08 |
|                           | ВАП       | 73,22  | 69  | 81   | 12     | 0,82     | 0,52   | 0,1  |
|                           | НАН       | 76,38  | 71  | 84   | 13     | 1,64     | 3,6    | 0,1  |
|                           | НАП       | 75,88  | 71  | 81   | 10     | -0,13    | 0,9    | 0,08 |

|                       | Третиране | средно | мин   | макс | размах | асиметр. | ексцес | s.e.  |      |
|-----------------------|-----------|--------|-------|------|--------|----------|--------|-------|------|
| Изсвиявяване<br>(дни) | ГД11      | ВА Н   | 69,82 | 67   | 73     | 6        | 0,29   | −0,09 | 0,04 |
|                       |           | ВА П   | 72,12 | 68   | 76     | 8        | 0,31   | 0,61  | 0,06 |
|                       |           | НА Н   | 73,56 | 70   | 78     | 8        | 0,24   | −0,18 | 0,07 |
|                       |           | НА П   | 73,56 | 70   | 78     | 8        | 0,24   | −0,18 | 0,07 |
|                       | С10       | ВА Н   | 71,14 | 67   | 77     | 10       | 0,15   | 0,83  | 0,07 |
|                       |           | НА Н   | 70,81 | 67   | 73     | 6        | 0,1    | −0,95 | 0,07 |
|                       | ГД10      | ВА Н   | 75,05 | 71   | 85     | 14       | 1,64   | 5,07  | 0,1  |
|                       |           | ВА П   | 73,36 | 69   | 82     | 13       | 0,77   | 0,5   | 0,12 |
|                       |           | НА Н   | 76,7  | 73   | 85     | 12       | 1,75   | 3,47  | 0,12 |
|                       |           | НА П   | 76,17 | 72   | 85     | 13       | 0,84   | 4,19  | 0,08 |
| ГД11                  | ВА Н      | 71,79  | 67    | 75   | 8      | −0,02    | −0,3   | 0,07  |      |
|                       | ВА П      | 74,55  | 70    | 79   | 9      | 0,74     | −0,34  | 0,12  |      |
|                       | НА Н      | 77,3   | 71    | 84   | 13     | 0,3      | 0,32   | 0,1   |      |
|                       | НА П      | 78,78  | 73    | 90   | 17     | 0,26     | 0,43   | 0,11  |      |
|                       | С10       | ВА Н   | 71,16 | 67   | 77     | 10       | 0,12   | 0,24  | 0,1  |
|                       |           | НА Н   | 71,4  | 69   | 75     | 6        | 0,05   | −0,92 | 0,08 |

Във всички експериментални среди азотният дефицит оказва редуциращ ефект върху височината на растенията и височината на залагане на кочана. Водният дефицит показва по-висок ефект върху тези признаци (Таблица 5-3), намалявайки в по-голяма степен средните стойности за двата признака. Тази тенденция е по-очевидна в експеримента проведен в Горни Дъбник през 2011 г. Тя вероятно се дължи на по-силен ефект на водният дефицит в сравнение с азотния стрес по време на вегетативната фаза. Ding et al (2005) и Hirel et al (2005) не установяват съществени разлики във фотосинтетичната активност на контролни растения и такива подложени на азотен дефицит. Според Hirel et al (2005) разликите стават достоверни едва 15 дни след цъфтежа на метлицата.

Таблица 5-3 – Описателна статистика на данните за височина на залагане на кочана и височина на растенията

|                                     |      | Третиране | средно | мин.  | макс.  | размах | асиметр. | ексцес | e.s. |
|-------------------------------------|------|-----------|--------|-------|--------|--------|----------|--------|------|
| Височина на залагане на кочана (cm) | ГД10 | ВА Н      | 110,21 | 81    | 137,67 | 56,67  | 0,01     | −0,54  | 0,54 |
|                                     |      | ВА П      | 127,62 | 92,5  | 150,33 | 57,83  | −0,26    | 0,46   | 0,46 |
|                                     |      | НА Н      | 110,77 | 83,2  | 139    | 55,8   | 0,1      | 0,12   | 0,47 |
|                                     |      | НА П      | 119,64 | 92    | 142,2  | 50,2   | −0,22    | 0,08   | 0,46 |
|                                     | ГД11 | ВА Н      | 120,7  | 94,7  | 141,5  | 46,8   | −0,11    | 0,22   | 0,36 |
|                                     |      | ВА П      | 128,62 | 101,8 | 154,3  | 52,5   | −0,2     | 0,05   | 0,44 |
|                                     |      | НА Н      | 100,79 | 72,8  | 127,8  | 55     | −0,31    | 0,05   | 0,43 |
|                                     |      | НА П      | 126,16 | 79,5  | 166    | 86,5   | −0,01    | 0,28   | 0,59 |
|                                     | С10  | ВА Н      | 97,87  | 80,83 | 122,5  | 41,67  | 0,1      | −0,56  | 0,38 |
|                                     |      | НА Н      | 94,16  | 72,5  | 110,83 | 38,33  | −0,02    | −0,1   | 0,35 |
| Височина на растенията (cm)         | ГД10 | ВА Н      | 266,37 | 221,5 | 300,5  | 79     | −0,34    | −0,09  | 0,7  |
|                                     |      | ВА П      | 298,23 | 240,5 | 325,67 | 85,17  | −0,58    | 1,48   | 0,57 |
|                                     |      | НА Н      | 260,46 | 216,2 | 298    | 81,8   | −0,08    | −0,4   | 0,7  |

|      | Третиране | средно | мин.   | макс.  | размах | асиметр. | ексцес | e.s. |
|------|-----------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|------|
| ГД11 | НА П      | 276,5  | 229,8  | 308,7  | 78,9   | -0,15    | 0,32   | 0,63 |
|      | ВА Н      | 277,01 | 247    | 297    | 50     | -0,5     | 0,67   | 0,37 |
|      | ВА П      | 310,89 | 273,8  | 339,8  | 66     | -0,22    | 0,42   | 0,52 |
|      | НА Н      | 238,44 | 197,3  | 276    | 78,7   | -0,56    | 0,34   | 0,69 |
|      | НА П      | 278,46 | 221    | 320,7  | 99,7   | 0,04     | 0,12   | 0,89 |
| С10  | ВА Н      | 242,24 | 216,67 | 264,17 | 47,5   | 0,07     | -0,38  | 0,44 |
|      | НА Н      | 237,06 | 203,33 | 262,5  | 59,17  | -0,1     | 0,19   | 0,48 |

През 2010 г. в ГД измерените средни за влажността на зърното в четирите условия не показват ясна тенденция за ефекта на експерименталните фактори (Таблица 5-4). Най- ниска средна стойност е установена в условието ВАН, а в двете третириания при ниски нива на азотно торене са изчислени по-високи стойности. В същата локация през следващата година поливния режимът показва по-силен ефект върху този признак, а комбинацията от двата стреса редуцира влажността на зърното до 12%.

Азотния дефицит оказва негативен ефект върху теглото на хиляда зърна в Горни Дъбник – 2010 г., намалявайки средното тегло с 21 и 23% съответно в НАН и НАП спрямо нестресираното третиране (ВАП). В Садово през същия сезон отчетената разлика между двете третириания е около два процента. При вторият експеримент в Горни Дъбник е отчетен спад в средните на всички експериментални условия в сравнение с предходната година. Редуцирането на масата хиляда зърна в условията с нисък азот е съответно 24 и 22%. Засушаването през 2011 оказва по-силен ефект върху този признак в сравнение с 2010, редуцирайки ТХЗ с 16% спрямо 11% в предходната година.

Таблица 5-4 – Описателна статистика на данните за влажност на зърното и тегло на хиляда зърна

|                          |      | Третиране | средно | мин    | макс   | размах | асимет<br>р. | ексцес | сг   |
|--------------------------|------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------|------|
| Влага в<br>зърното       | ГД10 | ВА Н      | 16,51  | 13,7   | 20,5   | 6,8    | 0,68         | -0,01  | 0,07 |
|                          |      | ВА П      | 18,38  | 15,3   | 22,3   | 7      | 0,36         | -0,02  | 0,06 |
|                          |      | НА Н      | 17,36  | 10,4   | 22,1   | 11,7   | 0,03         | 0,39   | 0,08 |
|                          |      | НА П      | 17,21  | 14,2   | 21,3   | 7,1    | 0,54         | 0,91   | 0,05 |
|                          | ГД11 | ВА Н      | 13,99  | 12,2   | 17,4   | 5,2    | 0,83         | 0,35   | 0,05 |
|                          |      | ВА П      | 18     | 14,9   | 23,1   | 8,2    | 0,36         | 0,7    | 0,06 |
|                          |      | НА Н      | 12,96  | 11,3   | 16,5   | 5,2    | 1,45         | 1,96   | 0,05 |
|                          |      | НА П      | 16     | 13     | 20,3   | 7,3    | 0,44         | 0,45   | 0,06 |
|                          | С10  | ВА Н      | 14,46  | 12,2   | 16     | 3,8    | -0,46        | -0,15  | 0,03 |
|                          |      | НА Н      | 13,86  | 11,2   | 16     | 4,8    | -0,2         | 0,13   | 0,04 |
| Тегло на<br>хиляда зърна | ГД10 | ВА Н      | 333,98 | 274,86 | 396,37 | 121,51 | 0,12         | -0,11  | 0,99 |
|                          |      | ВА П      | 373,29 | 293,12 | 422,88 | 129,77 | -0,33        | 0,45   | 0,97 |
|                          |      | НА Н      | 292,28 | 228,48 | 388,53 | 160,05 | 0,33         | -0,02  | 1,39 |
|                          |      | НА П      | 283,94 | 230,76 | 342,4  | 111,64 | 0,29         | -0,08  | 1    |
|                          | ГД11 | ВА Н      | 302,02 | 224,6  | 390,52 | 165,92 | 0,3          | 0,29   | 1,38 |
|                          |      | ВА П      | 358,37 | 239,98 | 428,27 | 188,29 | -0,5         | 1,51   | 1,3  |

| Третиране |      | средно | мин    | макс   | размах | асимет<br>р. | експес | сг   |
|-----------|------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------|------|
| C10       | НА Н | 272,59 | 219,61 | 401,1  | 181,49 | 0,5          | 3,1    | 1,04 |
|           | НА П | 284,15 | 225,76 | 337,94 | 112,18 | 0,14         | -0,11  | 0,97 |
|           | ВА Н | 318,66 | 253,55 | 390,54 | 136,99 | 0,07         | -0,2   | 1,23 |
|           | НА Н | 311,54 | 219,6  | 377,57 | 157,96 | -0,24        | 0,81   | 1,17 |

## 2. Корелации между добива зърно и останалите анализирани признаци

В настоящото проучване изследваните вторични признаци показват различни корелации с добива в зависимост от третирането и средата, в която събирани на данните. Корелацията между ДЗ и цъфтежа на двете съцветия в повечето третириания има отрицателни стойности. Установените значими корелации имат различен магнитут – от пренебрежимо слаби (-0.12) до умерено силни (-0.59). В повечето случаи ДИ показва по-силна корелация с добива в сравнение с ДЦМ. Изключение правят само третирианията ВАН в среди ГД10 и Сад10. Най- силна корелация между ДИ и ДЗ е наблюдавана в двете третириания с ниски нива на азотно торене в ГД11, къде е отчетено сравнително по-голямо закъснение на цъфтежа в следствие на стреса. То отразява способността на на растенията да пренасочват фотосинтетичен ресурс към развиващите се семена в стресови условия (Edmeades, Banziger, and Ribaut 2000), което обяснява по-силната корелация между признаците.

Признаците височина на залагане на кочана и височина на растенията в повечето случаи показват умерено силни (над 0.3) и значими, положителни корелации с добива. Корелациите на двата признака нарастват при ниските нива на азота с изключение на НАП-ГД10. Въпреки това в през същата година, в третирането комбиниращо стресовите нива и на двата фактора, се наблюдават най-силни корелации между тези признаци и добива. Badu-Abraku et al. (2012) също отчитат положителна корелация между двата признака и ДЗ в условия на азотен дефицит, а Ribaut et al. (2007) съобщават за засилване на корелацията при понижаване нивата на азота. Отчетените от нас корелации при неполивни условия са с по нисък магнитут от тези в изследването на Almeida et al. (2014). Високите корелации на тези признаци с добива вероятно отразяват по-голямата адаптивност към стрес при линиите с по-голяма височина. От друга страна Messmer et al. (2009) не наблюдават достоверна корелация между добива и височината на растенията, нещо повече, те картират алтернативно проявяващ се QTL, който при поливни условия в локация Зимбабве контролира височината на растенията, а в Мексико добива зърно.

Таблица 5. Корелации между добива и изследваните вторични признаци.

|      |     | ДЦМ                 | ДИ                  | ВК      | ВР      | ВЗ                  | ТХЗ                |
|------|-----|---------------------|---------------------|---------|---------|---------------------|--------------------|
| ГД10 | ВАН | -0,42***            | -0,38***            | 0,42*** | 0,43*** | -0,01 <sup>ns</sup> | 0,18***            |
|      | ВАП | -0,38***            | -0,41***            | 0,43*** | 0,43*** | -0,23***            | 0,02 <sup>ns</sup> |
|      | НАН | -0,36***            | -0,37***            | 0,62*** | 0,63*** | 0,19***             | 0,29***            |
|      | НАП | -0,42***            | -0,44***            | 0,33*** | 0,36*** | 0,08 <sup>ns</sup>  | 0,05 <sup>ns</sup> |
| ГД11 | ВАН | -0,07 <sup>ns</sup> | -0,12**             | 0,26*** | 0,22*** | 0                   | 0,09 <sup>ns</sup> |
|      | ВАП | 0,06 <sup>ns</sup>  | -0,01 <sup>ns</sup> | 0,26*** | 0,21*** | 0,08 <sup>ns</sup>  | 0,22***            |
|      | НАН | -0,4***             | -0,54***            | 0,43*** | 0,5***  | -0,11**             | -0,13**            |
|      | НАП | -0,16***            | -0,59***            | 0,48*** | 0,59*** | 0,12**              | 0,02 <sup>ns</sup> |

|       |     | ДЦМ      | ДИ       | ВК      | ВР      | ВЗ                  | ТХЗ                |
|-------|-----|----------|----------|---------|---------|---------------------|--------------------|
| Сад10 | ВАН | -0,19*** | -0,18*** | 0,22*** | 0,12**  | -0,09 <sup>ns</sup> | 0,06 <sup>ns</sup> |
|       | НАН | -0,23*** | -0,21*** | 0,16*** | 0,19*** | 0,07 <sup>ns</sup>  | 0,18**             |

Влажността на зърното и теглото на хиляда зърна показват незначителни или ниски корелации с добива. Най-силна корелация между ВЗ и добива е наблюдавана в третирането ВАП-ГД10 (Таблица 5), а за ТХЗ през същата година и локация в НАН. За последният Ribaut et al (2007) установяват висока степен на корелация с добива при оптимални условия (поливни с високи нива на азотно торене) и при ниски нива на азот комбинирани с напояване. В третирането подложено на сушев стрес, комбиниран азотен дефицит фенотипната корелация силно намалява.

От шестте вторични признака включени в настоящото изследване четири (ДЦМ, ДИ, ВК, ВР) показват до умерено силни достоверни корелации с добива при неблагоприятни условия. Имайки предвид по-високото ниво на приложените стресови фактори през 2011 г. в Горни Дъбник и магнитута на корелациите на ДИ и ВР с добива през този сезон, можем да заключим, че тези два признака са подходящи за използване при създаване на селекционни индекси за стресоустойчивост в популацията.

### 3. Оценка на компонентите на варианса на изследваните признаци

За оценяване на варианса на изследваните признаци са използвани представените в материал и методи смесени линейни модели, които дефинират основните източници на вариране като фиксирани, случайни и фактори, резултат от взаимодействието между два и повече основни фактори. Анализите са направени за двете години по отделно, поради непълнотата и хетерогенността на данните за измерваните признаци, получени в тях. Това до голяма степен предопредели и използването на тези модели.

При оценката на фиксираните източници на вариране и техните взаимодействия в двете последователни години 2010 г. (Таблица 6) и 2011г. (Таблица 7) в Горни Дъбник показват, че достоверното влияние на ефекта на повторението се различава при признаците добив на зърно (ДЗ), влажност на зърното (ВЗ) и тегло на хиляда зърна (ТХЗ), като през втората година (2011) този фактор има недостоверен ефект върху изброените признаци. Тези разлики в достоверността вероятно се дължат на по-голямо вариране в култивационните условия между повторенията през първата година, което се отразява на посочените признаци.

В Садово през 2010 г. (Таблица 8) факторът “повторение” има недостоверното влияние върху варирането на признаците ДЗ и ДЦМ, както и ВЗ. Недостоверно е влиянието на торенето и при признака ДИ. Този дизайн на експеримента в Садово е информативен и потвърждава тенденцията на влияние върху варирането на контролираните признаци в проведените полски опити, като подчертава различните климатични вариации и географско разположение на втората локация (през 2010 г.).

Основните контролирани фактори на експерименталния дизайн, азотното торене и поливния режим, показват висока достоверност и в двата сезона в Горни Дъбник. Важно е да се отбележи достоверното влияние на взаимодействието на нивата на азотно торене с поливния режим, което отразява значението на почвената влажност за ефективното усвояване на азота от почвата.

Положителни резултати от проведените експерименти могат да бъдат отнесени към високо достоверното влияние на азотното торене в двете локации и през двете експериментални години. Това подчертава както

значението на нивата на азотното торене за изследваните признаци, така и от необходимостта за изследване източниците на вариране с включване на генотиповете и взаимодействията на генотиповете с поливния режим и азотното торене като случайни ефекти.

Таблица 6. Източници на вариране с фиксиран ефект – Горни Дъбник - 2010

| Източници на вариация | ДЗ        | ДЦМ      | ДИ       | ВК        | ВР        | ВЗ       | ТХЗ       |
|-----------------------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                       | F         | F        | F        | F         | F         | F        | F         |
| Повторение            | 48,4***   | 62,7***  | 79,1***  | 25,1***   | 66,5***   | 125,8*** | 33,9***   |
| Повт. х блок          | 2,7***    | 4,7***   | 4,5***   | 6,3***    | 8,9***    | 7,2***   | 4,7***    |
| Н                     | 41,0***   | 110,9*** | 75,1***  | 1018,0*** | 2032,8*** | 250,9*** | 285,4***  |
| А                     | 2534,2*** | 674,0*** | 662,0*** | 91,4***   | 791,4***  | 11,8***  | 3495,4*** |
| Н х А                 | 491,3***  | 103,8*** | 100,9*** | 143,4***  | 274,1***  | 341,9*** | 687,1***  |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; F – стойност F-test; Нива на достоверност – ns (не достоверно), \* (<0.05), \*\* (<0.01), \*\*\* (0.001); Повт. х блок – интеракция повторение х блок; Н – напояване; А – азот; Н х А – интеракция напояване х азот.

Таблица 7. Източници на вариране с фиксиран ефект – Горни Дъбник - 2011

| Източници на вариация | ДЗ                | ДЦМ       | ДИ        | ВК        | ВР        | ВЗ                | ТХЗ               |
|-----------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
|                       | F                 | F         | F         | F         | F         | F                 | F                 |
| Повторение            | 1,3 <sup>ns</sup> | 7,6***    | 5,3**     | 20,3***   | 24,4***   | 0,3 <sup>ns</sup> | 1,7 <sup>ns</sup> |
| Повт. х блок          | 2,1***            | 2,5***    | 4,1***    | 3,8***    | 4,0***    | 3,2***            | 1,8***            |
| Н                     | 1235,5***         | 1082,0*** | 445,9***  | 1721,1*** | 3220,9*** | 3385,2***         | 1230,9***         |
| А                     | 10219,1***        | 2043,6*** | 2084,3*** | 792,5***  | 2766,3*** | 1058,8***         | 1631,5***         |
| Н х А                 | 945,2***          | 15,2***   | 38,1***   | 488,9***  | 28,6***   | 132,2***          | 686,4***          |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; F – стойност F-test; Нива на достоверност – ns (не достоверно), \* (<0.05), \*\* (<0.01), \*\*\* (<0.001); Повт. х блок – интеракция повторение х блок; Н – напояване; А – азот; Н х А – интеракция напояване х азот.

Таблица 8. Източници на вариране с фиксиран ефект – Садово - 2010

| Източници на вариация | ДЗ                | ДЦМ               | ДИ                | ВК      | ВР      | ВЗ                | ТХЗ     |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|---------|-------------------|---------|
|                       | F                 | F                 | F                 | F       | F       | F                 | F       |
| Повторение            | 0,8 <sup>ns</sup> | 3,2 <sup>ns</sup> | 5,6**             | 18,0*** | 18,0*** | 0,1 <sup>ns</sup> | 4,0**   |
| Повт. х блок          | 2,6***            | 2,3***            | 3,5***            | 1,5**   | 1,5**   | 3,1***            | 3,2***  |
| А                     | 105,1***          | 34,5***           | 0,5 <sup>ns</sup> | 61,4*** | 61,4*** | 111,1***          | 18,8*** |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; F – стойност F-test; Нива на достоверност – ns (не достоверно), \* (<0.05), \*\* (<0.01), \*\*\* (<0.001); Повт. х блок – интеракция повторение х блок; А – азот

Таблица 9. Компоненти на дисперсия определящи варирането на признаците в Горни Дъбник - 2010

| Източници на вариация | ДЗ                        | ДЦМ                       | ДИ             | ВК                        | ВР                        | ВЗ                        | ТХЗ                       |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                       | Комп. дисп.               | Комп. дисп.               | Комп. дисп.    | Комп. дисп.               | Комп. дисп.               | Комп. дисп.               | Комп. дисп.               |
| Генотип               | 0,33 ± 0,09***            | 0,30 ± 0,07***            | 0,25 ± 0,06*** | 21,42 ± 3,03***           | 45,94 ± 6,07***           | 0,39 ± 0,06***            | 121,70 ± 19,70***         |
| Генот. х Н            | 0,04 ± 0,06 <sup>ns</sup> | 0,00 ± 0,06 <sup>ns</sup> | - -            | 2,31 ± 1,65 <sup>ns</sup> | 3,24 ± 2,81 <sup>ns</sup> | 0,07 ± 0,04**             | 5,00 ± 9,00 <sup>ns</sup> |
| Генот. х А            | 0,27 ± 0,08***            | 0,01 ± 0,06 <sup>ns</sup> | - -            | - -                       | - -                       | 0,03 ± 0,03 <sup>ns</sup> | 38,70 ± 12,20***          |
| Остатък               | 2,03 ± 0,09***            | 2,05 ± 0,09***            | 2,31 ± 0,09*** | 51,15 ± 2,13***           | 89,05 ± 3,71***           | 1,01 ± 0,05***            | 300,40 ± 13,70***         |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; Комп. дисп. - Компонент на дисперсия ± se; Нива на достоверност - ns (не достоверно) \* (<0.05), \*\* (0.01), \*\*\* (0.001) – нивата на достоверност на компонентите на варианса са изчислени на базата на Z - тест; Генот. х Н– интеракция генотип х напоителен режим; Генот. х А– интеракция генотип х ниво на азота.

Таблица 10. Компоненти на дисперсия определящи варирането на признаците в Горни Дъбник - 2011

| Източници на вариация | ДЗ                        | ДЦМ                       | ДИ             | ВК              | ВР                        | ВЗ             | ТХЗ               |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|---------------------------|----------------|-------------------|
|                       | Комп. дисп.               | Комп. дисп.               | Комп. дисп.    | Комп. дисп.     | Комп. дисп.               | Комп. дисп.    | Комп. дисп.       |
| Генотип               | 0,17 ± 0,05***            | 0,26 ± 0,08***            | 0,27 ± 0,10*** | 20,44 ± 2,83*** | 26,50 ± 5,80***           | 0,26 ± 0,05*** | 142,70 ± 24,30*** |
| Генот. х Н            | 0,01 ± 0,04 <sup>ns</sup> | 0,06 ± 0,06 <sup>ns</sup> | - -            | - -             | 2,50 ± 4,30 <sup>ns</sup> | 0,20 ± 0,04*   | 20,60 ± 10,00*    |
| Генот. х А            | 0,09 ± 0,04*              | 0,22 ± 0,08**             | 0,19 ± 0,11*   | - -             | 5,40 ± 4,70 <sup>ns</sup> | 0,05 ± 0,02*   | 72,90 ± 15,00***  |
| Остатък               | 1,28 ± 0,06***            | 2,01 ± 0,09***            | 3,46 ± 0,14*** | 59,65 ± 2,29*** | 145,50 ± 6,60***          | 0,61 ± 0,03*** | 283,00 ± 12,90*** |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; Комп. дисп. - Компонент на дисперсия ± se; Ниво на достоверност - ns (не достоверно), \* (<0.05), \*\* (0.01), \*\*\* (0.001) – нивата на достоверност на компонентите на варианса са изчислени на базата на Z - тест; Генот. х Н– интеракция генотип х напоителен режим; Генот. х А– интеракция генотип х ниво на азота.

Таблица 11. Компоненти на дисперсия определящи варирането на признаците в Садово - 2010

| Източници на вариация | ДЗ                        | ДЦМ            | ДИ             | ВК                        | ВР               | ВЗ                        | ТХЗ                         |
|-----------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                       | Комп. дисп.               | Комп. дисп.    | Комп. дисп.    | Комп. дисп.               | Комп. дисп.      | Комп. дисп.               | Комп. дисп.                 |
| генот.                | 0,13 ± 0,08 <sup>ns</sup> | 0,41 ± 0,09*** | 0,45 ± 0,12*** | 11,50 ± 3,45***           | 26,90 ± 6,40***  | 0,05 ± 0,03*              | 82,00 ± 20,60***            |
| Генот. х А            | 0,22 ± 0,12*              | - -            | - -            | 3,38 ± 4,22 <sup>ns</sup> | - -              | 0,04 ± 0,04 <sup>ns</sup> | 28,10 ± 23,00 <sup>ns</sup> |
| Residual              | 1,58 ± 0,12***            | 1,60 ± 0,10*** | 2,54 ± 0,15*** | 60,81 ± 4,48***           | 126,50 ± 7,60*** | 0,54 ± 0,04***            | 316,70 ± 23,60***           |

Фактори със случайни нива в смесеният модел използван за анализ на данните от среда Сад - 2010. ДЗ – добив зърно; ДЦМ – дни до цъфтежа на метлицата; ДИ – дни до изсвляване; ВК – височина на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влажност на зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; Р – ниво на достоверност -ns (не достоверно) \* (<0.05), \*\* (0.01), \*\*\* (0.001) – нивата на достоверност на компонентите на варианса са изчислени на базата на Z - тест; Генот. х А– интеракция генотип х ниво на азота.

Като основен случаен ефект в предложението за работа смесен модел в дисертационния труд е включен генотипът на индивидите от популацията. В модела са включени още като взаимодействия на случайни ефекти генотип по поливен режим (само за 2010 г. и 2011г. в Горни Дъбник) и генотип по ниво на азотно торене. От представените в таблици 9, 10 и 11 оценки на вариансовите компоненти се вижда достоверното влияние на главния случаен ефект на генотипа при опитите, проведени в двете години в опитното поле на Горни Дъбник. Генотипът през 2010 година в Садово не влияе достоверно на признака ДЗ. Недостоверно е и взаимодействието на генотипа с нивото на азотно торене върху всички изследвани признаци с изключение на добив зърно. Оценките на компонентите, характеризиращи остатъчното вариране са достоверни, което е индикация за адекватност на избраният модел. От включените в модела източници на вариране основна роля играе и взаимодействието на генотипа с нивата на азотното торене. Достоверното влияние на ефекта от това взаимодействие, както и на генотиповете определят целесъобразността на картирането на локуси на количествени признаци (QTL). Взаимодействието на генотиповете с нивата на азотно торене са достоверни при ДЗ за всички локации и години. При признака ДЦМ, влиянието на взаимодействието на генотип по азотно торене е достоверно за Горни Дъбник 2011 г., докато за ГД 2010 е с недостоверен ефект, а при Садово 2010 г. има близка до нула, но отрицателна оценка. Оценките на вариансовите компоненти представляващи взаимодействия се постулират в моделите изчислявани с помощта на метода REML като не адитивни, за разлика от генотиповете, които са главен адитивен ефект. Това до голяма степен обуславя и липсата на оценки на вариансовите компоненти в представените таблици за неадитивните ефекти на взаимодействие на генотиповете със съответните среди (напоояване и торене) за редица признаци, характеризиращи изсвиването, височината на кочана и височината на растенията. Тези признаци се влияят пряко от главните адитивни вариансови компоненти, които се характеризират от използваните генотипове. В този контекст, взаимодействието на генотиповете с поливния режим е представено в много от случаите като вариансов компонент с недостоверно влияние или с липсваща (негативна) оценка, което вероятно се дължи на стабилността в проявяването на тези признаци при различни средови условия и относително високата сухоустойчивост на двете родителски линии.

#### **4. Генотипиране на дихаплоидната популация с молекулни маркери и конструиране на генетична карта.**

С цел конструиране на генетична карта родителските линии и индивидите от дихаплоидната популация са генотипирани с молекулни маркери. В изследването са използвани четири типа ДНК маркери, с помощта на които популацията е анализирана в 199 генетични локуса. От тях 68 са SSR, 19 IDP, 33 MITE-TD и 79 SNP локуса. Анализите на първите три типа маркери са извършени в лабораторията на АгроБиоИнститут-гр. София, а тези на SNP маркерите са проведени от фирма KWS Аинбек, Германия

PCR базираните STS (sequence tagged sites) маркери притежават редица преимущества, като висока възпроизводимост и простота на изпълнението. Основният им недостатък е ниското ниво на автоматизация, което ги прави трудоемки и силно оскъпява анализа в изследвания включващи голям брой маркери. За отстраняване на тези недостатъци в настоящето изследване е използван адаптиран вариант на метода предложен от Hayden et al.(2008) - MRT<sup>TM</sup> (multiplex-ready PCR technique). Той комбинира предимствата на мултиплекс PCR техника (Edwards and Gibbs, 1994) с предимствата на протокола за флуоресцентно белязване описан от Schuelke (2000). Методът позволява едновременно намножаване и белязване на PCR продукти в една и съща реакция. След PCR няколко мултиплексни реакции, белязани с различни флуорофори, могат да бъдат смесени и

анализирани едновременно на капиларен секвенатор, увеличавайки количеството на получената генотипна информация при един анализ на капиларен секвенатор. Адаптираният от нас протокол включва три стъпки на оптимизация – скриниране на родителските линии и F1 за полиморфизми, оптимизиране на условията за амплификация на полиморфните маркери и комбиниране на маркерите в мултиплексни реакции и тестване на качеството на получените ампликони (Tsonev et al 2013).

#### **4.1 Скриниране на полиморфни между родителските линии SSR и IDP маркери**

В първата стъпка на PCR оптимизация са определени полиморфните IDP и SSR маркери. За целта родителските генотипове и F1 са скринирани в 176 SSR и 96 IDP локуса.

От 176-те SSR маркера, 152 амплифицират ясни продукти при посочените по-горе температурни условия. Останалите двадесет и четири локуса са амплифицирани успешно, използвайки алтернативната PCR програма, означена в материали и методи като MRT-50. Шестдесет и осем SSR маркера показват различни алелни дължини при двете родителски линии и са определени като подходящи за включване в анализа на популацията.

При скрининга на IDP маркерите, 84 са определени като мономорфни между родителските форми, три маркера не амплифицират продукти, а останалите 19 показват полиморфни алели в родителските линии. Шестнадесет от полиморфните маркери са отчетени като кодоминантни и три като доминантни (генериращи PCR-продукт само в единия родител). За повечето от локусите, полиморфни или не, наблюдаваните алелни дължини са над 250 базови двойки. Тези резултати показват, че IDP локуси могат успешно да се комбинират със SSR-и в мултиплексни реакции и/или капиларна електрофореза. При два от IDP маркерите са амплифицирани повече един алел за генотип. IDP9111 продуцира два алела в XM-87-136, а IDP8945 има по два алела във всяка от родителските линии. Дължината на единият алел съвпада в родителските форми, а другите два се различават. Според Fu et al. (2006) този феномен се дължи на наличието на параложни последователности в генома на царевицата. Двата алела на IDP9111 в XM-87-136 са разположени близо един до друг, тъй като не се наблюдава сегрегация в картиращата популация.

На този етап при IDP маркерите е предприета допълнителна оптимизационна стъпка. С цел определяне на локуси подходящи за мултиплексиране с SSR-и, чиято успешна амплификация изисква използване на протокол MRT-50, всички полиморфни IDP маркери са изпитани при тези температурни условия. При повечето маркери не се наблюдават съществени разлики между двете PCR програми. Изключение правят IDP2384 и IDP8472, които продуцират множество неспецифични фрагменти при втората PCR програма.

#### **4.2 Оптимизиране на мултиплексен PCR метод за паралелно генотипиране на SSR и IDP маркери на капиларен секвенатор.**

Основното предимство на използвания в експеримента мултиплекс-PCR протокол са унифицираните температурни условия на реакцията, при които едновременно се амплифицират праймерни последователности с различна температура на топене. Методът се състои от два етапа, различаващи се по температурата на хибридизация на праймерите. По време на първият етап, включващ стъпка на хибридизация при 63°C, локус специфичните праймери се инкорпорират в състава на небелязани реакционни продукти. Във втория етап, температурата на анилинг се понижава до 54°C и универсалните праймери се включват в амплификацията, образувайки флуоресцентно белязани продукти. Важно за специфичността на продуктите е изчерпването на

ЛСП по време на първата фаза на реакцията. Поради тази причина определянето на оптимална концентрация за ЛСП е най-важната оптимизационна стъпка в MRT™ протокола.

Оптимизирането на праймерната концентрация на SSR-ите е осъществено, чрез тестване на амплификацията на полиморфните маркери при три концентрации на ЛСП (20, 40 и 124 nmol ) с ДНК от ХМ-87-136. За оптимална концентрация е приемана минималната даваща ясно определим продукт. От тестваните концентрации 20 и 40 nmol са определени като оптимални съответно за 43 и 20 от SSR маркерите. За четири от локусите 80 nmol е най-подходящата концентрация, а локус bnlgl1940 показва най-добър резултат при 120 nmol.

Всички 87 маркера (SSR + IDP) са амплифицирани в двадесет и седем мултиплексни и една униплексна реакции. В шестнадесет от мултиплексните реакции, включващи само SSR-и са амплифицирани 48 локуса (Таблица 12). Един SSR (bnlg1784) е амплифициран в униплексна реакция. Мултиплексните реакции включват между два и шест локуса (средно по 3.2 локуса на реакция).

Двадесет и седемте реакции са групирани в единадесет панела, включващи две или три реакции, белязани с различни флуоресцентни багрила. Тези, принадлежащи към един същ панел са смесени и анализирани на капиларен секвенатор. По този начин в една капилярна електрофореза са анализирани едновременно 7.9 локуса. Адаптираният от нас метод показва висока ефикасност. Почти всички маркери са амплифицирани и успешно генотипирани по описания протокол. Изключение правят маркерите bnlgl1484, IDP8472 и IDP8984 при които бяха отчетени висок процент липсващи генотипове в дихаплоидната популация и бяха изключени при конструирането на генетичната карта.

Таблица 12. Списък на полиморфните маркери по реакции и панели

| Nr | Маркер   | Хр. бин | Панел | Цвят багрило | Конц. прайм. | Ta | B37 | ХМ-87-136 | Тип |
|----|----------|---------|-------|--------------|--------------|----|-----|-----------|-----|
| 1  | umc1221  | 5,04    | A     | син          | 40           | 63 | 109 | 116       | SSR |
| 2  | bnlg1940 | 2,08    | A     | син          | 124          | 63 | 242 | 249       | SSR |
| 3  | phi046   | 3,08    | A     | жълт         | 83           | 63 | 97  | 100       | SSR |
| 4  | bnlg1526 | 10,04   | A     | жълт         | 20           | 63 | 147 | 151       | SSR |
| 5  | umc1136  | 3,09    | A     | жълт         | 20           | 63 | 171 | 187       | SSR |
| 6  | bnlg1839 | 10,07   | A     | жълт         | 20           | 63 | 219 | 217       | SSR |
| 7  | phi96100 | 2       | A     | жълт         | 40           | 63 | 321 | 327       | SSR |
| 8  | umc1225  | 5,08    | A     | червен       | 20           | 63 | 163 | 157       | SSR |
| 9  | phi123   | 6,07    | A     | червен       | 20           | 63 | 177 | 182       | SSR |
| 10 | bnlg1074 | 10,05   | A     | червен       | 20           | 63 | 210 | 205       | SSR |
| 11 | phi041   | 10      | A     | червен       | 20           | 63 | 236 | 228       | SSR |
| 12 | phi050   | 10,03   | B     | син          | 83           | 63 | 112 | 114       | SSR |
| 13 | phi083   | 2,04    | B     | син          | 20           | 63 | 157 | 155       | SSR |
| 14 | bnlg1129 | 9,08    | B     | син          | 20           | 63 | 225 | 217       | SSR |
| 15 | dupssr21 | 2,05    | B     | жълт         | 83           | 63 | 132 | 140       | SSR |
| 16 | umc1194  | 4,07    | B     | жълт         | 20           | 63 | 191 | 176       | SSR |
| 17 | phi025   | 6,05    | B     | жълт         | 20           | 63 | 243 | 243/249   | SSR |
| 18 | umc1125  | 7,04    | B     | червен       | 40           | 63 | 130 | 104       | SSR |
| 19 | umc1014  | 6,04    | B     | червен       | 20           | 63 | 174 | 150       | SSR |
| 20 | umc1277  | 9,08    | B     | червен       | 40           | 63 | 170 | 166       | SSR |

| Nr | Маркер    | Хр. бин | Панел | Цвят багрило | Конц. прайм. | Ta | B37     | ХМ-87-136 | Тип |
|----|-----------|---------|-------|--------------|--------------|----|---------|-----------|-----|
| 21 | phi116    | 7,06    | B     | червен       | 20           | 63 | 202/206 | 206       | SSR |
| 22 | bnlg1784  | 4,07    | B     | зелен        | 20           | 63 | 271     | 267       | SSR |
| 23 | phi089    | 6,08    | C     | син          | 40           | 63 | 113/119 | 119       | SSR |
| 24 | phi299852 | 6,07    | C     | син          | 20           | 63 | 152     | 162       | SSR |
| 25 | phi031    | 6,04    | C     | син          | 20           | 63 | 215     | 252       | SSR |
| 26 | bnlg1265  | 4,05    | C     | син          | 40           | 63 | 263     | 259       | SSR |
| 27 | phi128    | 5,07    | C     | жълт         | 83           | 63 | 138     | 143       | SSR |
| 28 | phi080    | 8,09    | C     | жълт         | 20           | 63 | 190     | 194       | SSR |
| 29 | bngl1031  | 8,06    | C     | червен       | 40           | 63 | 140     | 114       | SSR |
| 30 | bngl1360  | 10,07   | C     | червен       | 20           | 63 | 171     | 154       | SSR |
| 31 | bngl1138  | 2,06    | C     | червен       | 40           | 63 | 214     | 219       | SSR |
| 32 | phi069    | 7,05    | C     | червен       | 40           | 63 | 227     | 236       | SSR |
| 33 | bngl278   | 5,05    | D     | син          | 20           | 63 | 115     | 129       | SSR |
| 34 | phi423796 | 6,01    | D     | син          | 20           | 63 | 169     | 162       | SSR |
| 35 | phi076    | 4,11    | D     | син          | 40           | 63 | 190     | 195       | SSR |
| 36 | phi006    | 4,11    | D     | червен       | 40           | 63 | 115     | 120       | SSR |
| 37 | bngl589   | 4,1     | D     | червен       | 20           | 63 | 184     | 202       | SSR |
| 38 | bnlg1714  | 9,04    | D     | червен       | 40           | 63 | 229/272 | 272       | SSR |
| 39 | zca391    | 6,01    | E     | син          | 40           | 63 | 117     | 126       | SSR |
| 40 | umc1035   | 1,06    | E     | син          | 40           | 63 | 169     | 179       | SSR |
| 41 | bngl1056  | 8,08    | E     | червен       | 20           | 63 | 122     | 136       | SSR |
| 42 | phi059    | 10,02   | E     | червен       | 20           | 63 | 187     | 178       | SSR |
| 43 | umc1279   | 9       | F     | син          | 20           | 63 | 126     | 129       | SSR |
| 44 | bnlg1484  | 1,03    | F     | син          | 20           | 63 | 146     | 159       | SSR |
| 45 | phi077    | 6,01    | F     | син          | 40           | 63 | 182     | 174       | SSR |
| 46 | bngl1732  | 6,05    | F     | жълт         | 40           | 63 | 142     | 130       | SSR |
| 47 | umc1847   | 4,07    | F     | жълт         | 40           | 63 | 184     | 176       | SSR |
| 48 | bngl118   | 5,07    | F     | червен       | 20           | 63 | 154     | 146       | SSR |
| 49 | umc1678   | 10,04   | F     | червен       | 20           | 63 | 183     | 179       | SSR |
| 50 | IDP8945   | 6,05    | G     | червен       | 60           | 50 | 359/379 | 333/359   | IDP |
| 51 | phi008    | 5,03    | G     | червен       | 10           | 50 | 138     | 134       | SSR |
| 52 | phi233376 | 8,09    | G     | червен       | 20           | 50 | 172     | 177       | SSR |
| 53 | bngl1237  | 5,05    | G     | червен       | 40           | 50 | 187     | 230       | SSR |
| 54 | phi101049 | 2,1     | G     | червен       | 40           | 50 | 259     | 271       | SSR |
| 55 | phi070    | 6,07    | G     | син          | 40           | 50 | 98      | 103       | SSR |
| 56 | umc1083   | 6,02    | G     | син          | 40           | 50 | 139     | 141       | SSR |
| 57 | umc1196   | 10,07   | G     | син          | 10           | 50 | 183     | 188       | SSR |
| 58 | phi024    | 5,01    | G     | син          | 10           | 50 | 383     | 389       | SSR |
| 59 | IDP2388   | 2,02    | H     | червен       | 10           | 50 | 384     | 369       | IDP |
| 60 | IDP9111   | 3,09    | H     | червен       | 20           | 50 | 455     | 412/450   | IDP |
| 61 | dupssr28  | 4,08    | H     | червен       | 20           | 50 | 150     | 160       | SSR |
| 62 | umc1076   | 1,05    | H     | червен       | 40           | 50 | 281     | 323       | SSR |
| 63 | IDP3987   | 2,01    | H     | син          | 20           | 50 | 403     | 401       | IDP |

| Nr | Маркер    | Хр. бин   | Панел | Цвят багрило | Конц. прайм. | Ta | B37     | XM-87-136 | Тип |
|----|-----------|-----------|-------|--------------|--------------|----|---------|-----------|-----|
| 64 | IDP3956   | 6,06      | H     | син          | 40           | 50 | 427     | 423       | IDP |
| 65 | umc1257   | 6,02      | H     | син          | 20           | 50 | 191     | 197       | SSR |
| 66 | bngl1371  | 6,01      | H     | жълт         | 20           | 50 | 149     | 155       | SSR |
| 67 | bngl1191  | 9,06      | H     | жълт         | 40           | 50 | 235     | 250       | SSR |
| 68 | IDP8472   | 5,01      | I     | червен       | 40           | 63 | 487     | 425       | IDP |
| 69 | IDP458    | 5,05      | I     | червен       | 20           | 63 | 250/376 | -         | IDP |
| 70 | IDP8984   | 5,05      | I     | червен       | 20           | 63 | 364     | 349       | IDP |
| 71 | umc1122   | 1,06-1,07 | I     | червен       | 10           | 63 | 195     | 196       | SSR |
| 72 | phi101    | 5,06      | I     | червен       | 10           | 63 | 126     | 129       | SSR |
| 73 | IDP3972   | 2,02      | I     | син          | 10           | 63 | -       | 377       | IDP |
| 74 | IDP7242   | 2,09      | I     | син          | 20           | 63 | 336     | 302       | IDP |
| 75 | IDP2006   | 10,02     | I     | син          | 40           | 63 | 450     | 443       | IDP |
| 76 | IDP1991   | 4,08      | J     | червен       | 40           | 63 | 449     | 486       | IDP |
| 77 | IDP4247   | 6,04      | J     | червен       | 20           | 63 | 435     | 411       | IDP |
| 78 | IDP475    | 10,03     | J     | червен       | 40           | 63 | 295     | 401       | IDP |
| 79 | bngl1065  | 8,07      | J     | червен       | 40           | 63 | 267     | 254       | SSR |
| 80 | IDP3976   | 1,03      | J     | син          | 20           | 63 | 404     | 385       | IDP |
| 81 | IDP6975   | 1,05      | J     | син          | 10           | 63 | 455     | 476       | IDP |
| 82 | IDP342    | 4,11      | J     | син          | 10           | 63 | 352     | -         | IDP |
| 83 | phi113    | 5,03-5,04 | J     | син          | 10           | 63 | 150     | 320       | SSR |
| 84 | nc009     | 6,04      | K     | червен       | 20           | 63 | 175     | 151       | SSR |
| 85 | IDP2384   | 10,03     | K     | червен       | 20           | 63 | 389     | 435       | IDP |
| 86 | IDP4196   | 6,02      | K     | син          | 10           | 63 | 405     | 420       | IDP |
| 87 | phi227562 | 1,11      | K     | син          | 20           | 63 | 353     | 341       | SSR |

Хр. бин – хромозомен бин; Конц. прайм. - концентрация на ЛСП (nmol); Ta – температурни условия на реакцията.

#### 4.3 Адаптиране на TD-AFLP метод и генотипиране на полиморфни фрагменти в ДН популация на капилярен секвенатор

MITE (подвижни елементи съдържащи миниатюрни обърнати повтори) транспозоните са най-високо представените подвижни генетични елементи в семейство житни (Feschotte, Jiang and Wessler 2002). Този факт в комбинация с високата им консервативност (Zerjal et al., 2009) ги прави удобни ДНК маркери за допълнително насищане на генетичните карти, в случаите в които липсват секвенционни данни за дадената популация.

В настоящето изследване са използвани две MITE семейства (Hbr и ZmV1), принадлежащи към суперсемейството на Tourist-like подвижни елементи в генома на царевицата.

Оптимизацията е проведена с двукратно първоначално тестване на протокола с ДНК на родителските форми и F1, по методологията описана в “Материали и методи”. След получаване на сравними електрофоретични профили на продуктите от преселективните амплификации и повторяеми резултати от селективните, протоколът е приложен за генотипиране на всички индивиди на дихаплоидната популация.

В резултат на анализа на генерираните продукти в популацията общо 33 фрагмента от осемте селективни праймерни комбинации са определени, като стабилно проявяващи се полиморфизми, шестнадесет от които са

наследени от B37, а седемнадесет от XM87-136. Най-много полиморфизми (девет) са установени с комбинацията Hbr/MseI-C, докато при останалите комбинации полиморфизмите варират между четири и седем. В две от комбинациите на ZmV1 (с MseI-A и G) не са установени полиморфни фрагменти.

### **5. Конструирание на интегрирана SNP, SSR, IDP, TD-AFLP генетична карта**

За изготвяне на генетичната карта, към генотипните данни за гореописаните маркери (67 SSR, 17 IDP и 33 MITE-AFLP маркера) са добавени и тези за 79 SNP локуса, генотипирани от фирма KWS. Общо за генетичната карта са използвани 196 полиморфни между родителските линии локуса. След анализ на информацията за всички маркери, 49 генотипа са изключени по различни причини от по-нататъшната работа по конструирание на картата. Двадесет и два генотипа са определени като повтарящи се, десет са изключени поради висок процент на хетерозиготност ( $>10$  локуса), а останалите седемнадесет- поради липсващи данни за голям брой локуси (предимно SNP).

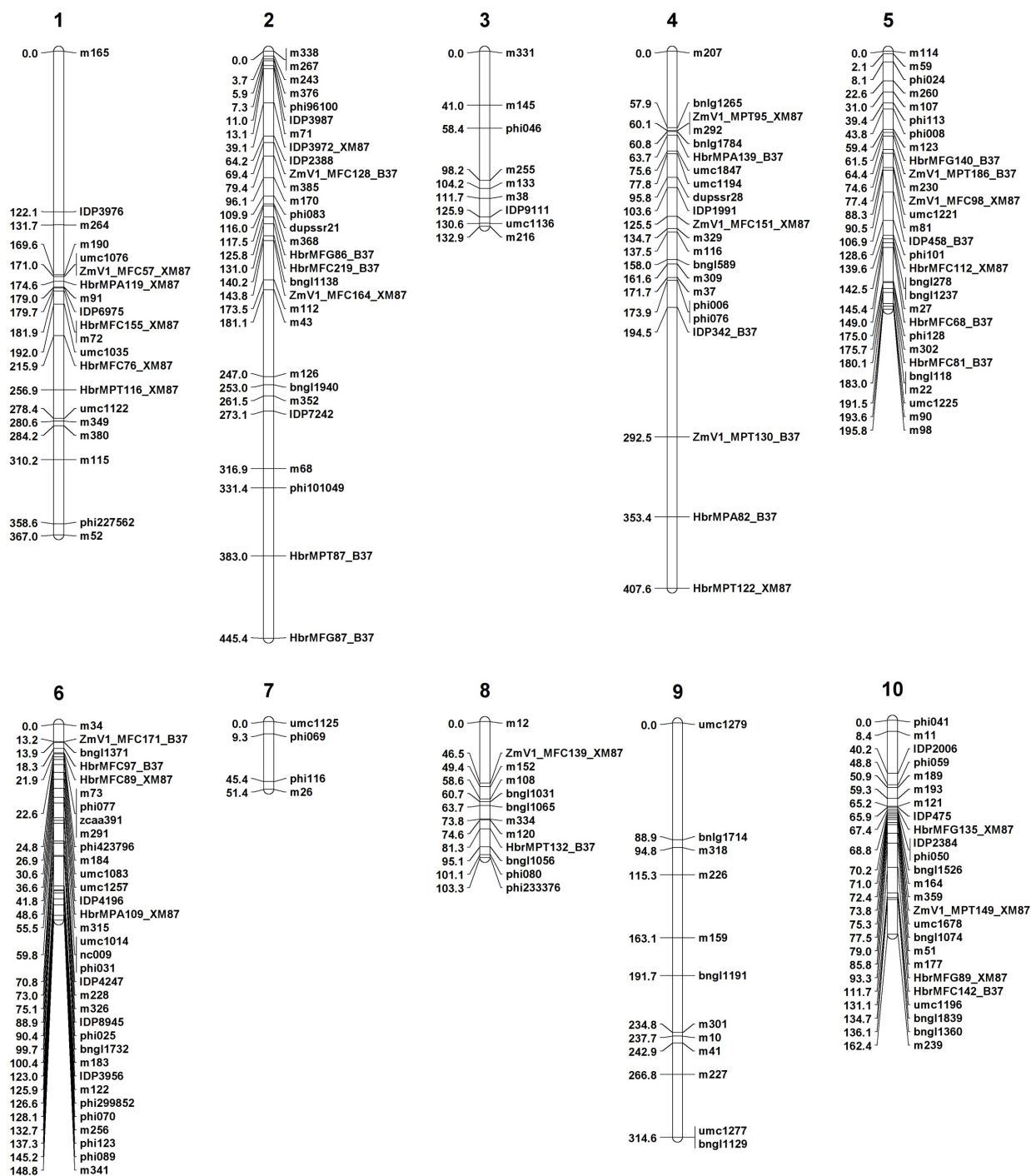
Генетичната карта е конструирана със софтуер QTL IciMapping-4.0, чрез “Халдейн” функция. Получената карта е с обща дължина от 2329 cM. Средната дистанция между маркерите е 11,9 cM. В картата се наблюдават общо 17 интервала с дължина над 40 cM. Най-голям, 122 cM, е този между m165 и IDP3976 на първа хромозома. Броят на маркерите отнесени към дадена група на скачване варира от 4 на 7-ма хромозома до 34 на 6-та (Фиг. 1). Средното генетично разстояние между маркерите е по-малко от това описано от Messmer (2006), но в конструираната от нас генетична карта, маркерите са разположени неравномерно по дължината на хромозомите. Това разпределение вероятно се дължи на естеството на изследваната популация и ниското ниво на полиморфизъм между родителските линии в някои хромозомни райони.

Шестдесет маркера (31%) показват значими ( $p<0,01$ ) отклонения от очакваното разпадане за дихаплоидна популация. Повечето от тях са групирани в последователности от 2 до 4 локуса по всички хромозоми с изключение на 7-ма и 8-ма. Най-много “отклоняващи се” локуси се наблюдават на 6-та хромозома, където се локализируют 21 от тях. Деветнадесет от тези локуси са разположени последователно по хромозомата. При по-голямата част от маркерите (42 локуса) равновесието е изтеглено към генотипа на химическия мутант XM87-136. Това явление е често срещано при растенията. То е по-характерно за популации с висока степен на инбредност, като DH и RIL отколкото за  $F_2$  популации. Причините за него могат да са разлики във фертилността на гаметите, кълняемостта на семената, преживяемостта при определени условия или неволна изкуствена селекция от страна на експериментатора. Съществуват противоречиви данни относно ефекта на тези отклонения върху групирането и подреждането на маркерите в генетичната карта. Според Hackett and Broadfoot (2003) те имат малък ефект върху структурата на картата, докато според други автори е свързано с намаляване на дължината ѝ (Semagn et al., 2006). Влиянието на неравномерната сегрегация на маркерите върху детекцията на QTL-и е различно в зависимост от картираните ефекти. Тя намалява силата на детекцията на доминантните ефекти, но може да я повиши при изследване на адитивни ефекти (Xu 2008).

### **5 Картиране на QTL при контрастни нива на азотното торене в отделните години на изпитване**

Тъй като взаимодействието генотип-напояване не оказва съществено влияние върху добива или някой от признаците свързани с него в стресови условия, в настоящото изследване за картиране на QTL са използвани BLUP оценки на признаците, получени от комбинирания анализ на поливни и неполивни третирания за

съответното ниво на азот при всяка година на изпитване.



Фиг. 1. Генетична карта на картиращата популация

### 5.1. Картиране на QTL за сезон 2010 г. при ниски и високи нива на азотно торене

При анализа на полските опити в Горни Дъбник 2010 г. са установени общо четиридесет QTL-а за седемте изследвани фенотипни признака. От установените QTL-и, деветнадесет са картирани при ниско ниво и двадесет и един, при високо ниво на азотно торене (Таблица 13).

Таблица 13 Общ брой QTL и свързаната с тях фенотипна вариация, картирани при анализ на опитите в Горни Дъбник 2010 г. при две нива на азотно торене

|    | ДЗ      |       | ДЦМ     |       | ДИ      |       | ВК      |       | ВР      |       | ВЗ      |       | ТХЗ     |       |
|----|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|    | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   |
| НА | 1       | 12,08 | 1       | 10,58 | 1       | 11,23 | 4       | 78,98 | 4       | 46,08 | 5       | 50,69 | 3       | 42,39 |
| ВА | 2       | 32,56 | 1       | 10,59 | 1       | 9,11  | 4       | 50,25 | 4       | 49,69 | 4       | 42,04 | 5       | 59,59 |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – Дни до цъфтежа на метлицата; ВК – височина на залагане на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влага в зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; Бр. QTL – брой на QTL-ите; ПВО - процентът от вариацията обяснена от QTL-а

#### 5.1.1. QTL за признака добив зърно

За признака добив зърно (ДЗ) са картирани два QTL-а, единият от които, на пета хромозома, се проявява и при двете нива на азотно торене. Вторият QTL, локализиран върху десета хромозома, се проявява само при високи нива на азот (Таблица 5-14). Двата QTL-а, експресиращи се при ВА обясняват 32,56% от варирането на добива в тези условия (Таблица 5-14). QTL-ът картиран на хромозома 5 при НА обяснява около 12,08% от варирането на признака. Посоката на адитивните ефекти на QTL-ите (Таблица 5-14) показва, че алелите оказващи благоприятен ефект върху експресията на признака добив зърно (ДЗ) и за двата QTL се наследяват от втория родител (XM87-136).

#### 5.1.2. QTL за признака тегло на 1000 зърна

QTL-и, контролиращи теглото на хиляда зърна при двете нива на азотно торене, са детектирани на четири различни хромозоми (Таблица 5-14). На десета хромозома са картирани два QTL-а (позиции 72 и 91 cM), алтернативно проявяващи се при ниско и съответно високо ниво на азотно торене. Тези локуси обясняват най-голям процент от варирането на признака при съответните нива на азотно торене. Алелите свързани с повишаване на стойността на признака се наследяват от мутантната линия XM87-136.

#### 5.1.3. QTL за признака влага в зърното

При ниски нива на азотно торене в среда ГД10 са установени пет QTL-а за признака влага в зърното (ВЗ) , разположени върху четири хромозоми (Таблица 14). Картираните QTL-и обясняват между 6 и 16,5% от варирането на признака. Най-висок процент от варианса определя този, разположен на втора хромозома в позиция 64 cM. QTL в същата хромозомна позиция се проявява и при високи нива на азотно торене, където обяснява над 14% от варирането на влажността на зърното.

Таблица 5-14. QTL-и картирани при ниски и високи нива на азотно торене в сезон ГД10

|    | Признак | Хромоз | cM  | Ляв Маркер   | Десен Маркер | LOD  | ПВО   | Адит. Еф |
|----|---------|--------|-----|--------------|--------------|------|-------|----------|
|    | ДЗ      | 5      | 162 | HbrMFC68_B37 | phi128       | 3.43 | 12.08 | -0.36    |
| НА | ТХЗ     | 2      | 64  | IDP3972_XM87 | IDP2388      | 4.47 | 10.22 | 0.32     |
|    | ТХЗ     | 5      | 31  | m107         | phi113       | 6.59 | 15.50 | 0.40     |

| Признак | Хромоз | сМ  | Ляв Маркер      | Десен Маркер     | LOD   | ПВО   | Адит. Еф |
|---------|--------|-----|-----------------|------------------|-------|-------|----------|
| TX3     | 10     | 72  | m164            | m359             | 7.02  | 16.67 | -0.41    |
| B3      | 1      | 150 | m264            | m190             | 3.48  | 11.17 | 0.32     |
| B3      | 2      | 64  | IDP3972_XM87    | IDP2388          | 7.31  | 16.51 | 0.39     |
| B3      | 4      | 138 | m116            | bngl589          | 4.02  | 8.63  | 0.29     |
| B3      | 5      | 40  | phi113          | phi008           | 2.94  | 6.19  | 0.24     |
| B3      | 5      | 178 | m302            | HbrMFC81_B37     | 3.68  | 8.19  | -0.29    |
| ДЦМ     | 10     | 133 | umc1196         | bngl1839         | 3.29  | 10.58 | 0.31     |
| ДИ      | 10     | 128 | HbrMFC142_B37   | umc1196          | 3.43  | 11.23 | 0.34     |
| BK      | 1      | 162 | m264            | m190             | 8.12  | 21.14 | 0.42     |
| BK      | 4      | 89  | umc1194         | dupssr28         | 3.74  | 8.31  | 0.27     |
| BK      | 5      | 156 | HbrMFC68_B37    | phi128           | 15.84 | 41.28 | -0.60    |
| BK      | 6      | 101 | m183            | IDP3956          | 4.21  | 8.24  | 0.26     |
| BP      | 1      | 142 | m264            | m190             | 4.17  | 9.28  | 0.30     |
| BP      | 2      | 141 | bngl1138        | ZmV1_MFC164_XM87 | 4.01  | 7.26  | 0.27     |
| BP      | 5      | 176 | m302            | HbrMFC81_B37     | 10.92 | 21.62 | -0.47    |
| BP      | 8      | 101 | bngl1056        | phi080           | 4.49  | 7.93  | -0.27    |
| ДЗ      | 5      | 164 | HbrMFC68_B37    | phi128           | 7.14  | 24.35 | -0.51    |
| ДЗ      | 10     | 82  | m51             | m177             | 2.89  | 8.21  | -0.29    |
| TX3     | 2      | 64  | IDP3972_XM87    | IDP2388          | 4.03  | 7.56  | 0.27     |
| TX3     | 2      | 438 | HbrMPT87_B37    | HbrMFG87_B37     | 3.54  | 8.95  | 0.31     |
| TX3     | 4      | 7   | m207            | bngl1265         | 3.32  | 8.23  | -0.29    |
| TX3     | 5      | 31  | m107            | phi113           | 7.48  | 14.80 | 0.39     |
| TX3     | 10     | 91  | m177            | HbrMFG89_XM87    | 9.29  | 20.06 | -0.45    |
| B3      | 1      | 153 | m264            | m190             | 3.17  | 11.82 | 0.34     |
| B3      | 2      | 63  | IDP3972_XM87    | IDP2388          | 5.67  | 14.69 | 0.37     |
| B3      | 4      | 140 | m116            | bngl589          | 3.32  | 8.42  | 0.29     |
| BA      | B3     | 5   | m302            | HbrMFC81_B37     | 2.93  | 7.11  | -0.27    |
| ДЦМ     | 10     | 133 | umc1196         | bngl1839         | 3.29  | 10.59 | 0.31     |
| ДИ      | 10     | 132 | umc1196         | bngl1839         | 2.91  | 9.11  | 0.29     |
| BK      | 1      | 174 | ZmV1_MFC57_XM87 | HbrMPA119_XM87   | 3.12  | 7.48  | 0.26     |
| BK      | 4      | 115 | IDP1991         | ZmV1_MFC151_XM87 | 2.64  | 7.32  | 0.27     |
| BK      | 5      | 157 | HbrMFC68_B37    | phi128           | 9.31  | 29.12 | -0.52    |
| BK      | 6      | 74  | m228            | m326             | 2.66  | 6.34  | 0.24     |
| BP      | 1      | 144 | m264            | m190             | 4.00  | 9.73  | 0.30     |
| BP      | 2      | 142 | bngl1138        | ZmV1_MFC164_XM87 | 4.32  | 8.38  | 0.29     |
| BP      | 5      | 166 | HbrMFC68_B37    | phi128           | 9.88  | 23.12 | -0.48    |
| BP      | 8      | 101 | bngl1056        | phi080           | 4.57  | 8.46  | -0.28    |

Хромоз – име на хромозома;сМ – позицията на QTL-а от началото на хромозомата в сМ; Ляв и Десен маркер - маркерите ограничаващи интервала; ПВО – процентът от вариацията обяснена от QTL-а; Адитивен Еф. - адитивен ефект на локуса. Отрицателните стойности показват че алелът повишаващ стойността на признака е наследен от XM-87-136, а положителните че е наследен от B37

#### 5.1.4. QTL за признаците дни до цъфтеж на метлицата и дни до изсвляване

През този сезон е детектиран един QTL контролиращ дните до цъфтежа на метлицата и при двете нива на азотно торене. Той се локализира в една и съща позиция на хромозома 10 (133 сМ) и в двете третираня и обяснява 10,6% от варирането на признака (Таблица 14). В същият интервал на един сантиморган разстояние от този локус (132 сМ) при високи нива на азотно торене е локализиран QTL свързан с изсвляването. При ниски нива на азотно торене за този признак е картиран локус на същата хромозома в позиция 128 сМ. Двата QTL-а обясняват съответно 9 и 11% от варирането на признака при ВА и НА.

#### 5.1.5. QTL за признаците височина на залагане кочана и височина на растението

За височината на залагане на кочана при ниски нива на азотно торене са картирани четири QTL-а разположени върху четири хромозоми (1, 4, 5 и 6) (Таблица 14). Локусът разположен в позиция 156 сМ на хромозома 5 оказва най-голям ефект върху фенотипната изява на признака, обяснявайки над 41% от варирането му. Изявата на последния се наблюдава и при високи нива на азотно торене, където той отново показва най-силен ефект. Останалите три QTL-а, картирани при високо ниво на азотно торене са локализирани върху същите хромозоми (1, 4 и 6), но попадат в различни маркерни интервали

В двете нива на азотно торене са установени пет QTL-а, контролиращи височината на растенията (Таблица 5-14). На пета хромозома са установени QTL-и, специфично проявяващи се при НА (позиция 176 сМ) и съответно ВА (166 сМ). Тези два локуса оказват най-голям ефект върху височината на растенията в съответните среди, обяснявайки над 20% от фенотипното вариране.

#### 5.2. Картиране на QTL за сезон 2011 г. при ниски и високи нива на азотно торене

При анализа са установени общо 43 QTL-а за седемте изследвани фенотипни признака. От установените QTL-и, 18 са картирани при ниско ниво и 25, при високо ниво на азотно торене (Таблица 15). Подобно на предходния сезон и през 2011 г. повечето установени QTL-и се проявяват при високи нива на азотно торене.

Таблица 5-15 Общ брой QTL и свързаната с тях фенотипна вариация, картирани при анализ на опитите в Горни Дъбник 2011 г. при две нива на азотно торене

|    | ДЗ      |       | ДЦМ     |       | ДИ      |     | ВК      |       | ВР      |       | ВЗ      |       | ТХЗ     |       |
|----|---------|-------|---------|-------|---------|-----|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|    | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   | Бр. QTL | ПВО   |
| НА | 1       | 8,25  | -       | -     | -       | -   | 4       | 53,04 | 3       | 54,40 | 6       | 63,37 | 4       | 46,73 |
| ВА | 2       | 17,54 | 3       | 30,06 | -       | -   | 5       | 43,26 | 3       | 39,63 | 6       | 64,75 | 6       | 69,27 |

ДЗ – добив зърно; ДЦМ – Дни до цъфтежа на метлицата; ВК – височина на залагане на кочана; ВР – височина на растенията; ВЗ – влага в зърното; ТХЗ – тегло на хиляда зърна; Бр. QTL – брой на QTL-ите; ПВО – процентът от вариацията обяснена от QTL-а

##### 5.2.1. QTL за признака добив зърно

В тази среда са картирани също два QTL-а оказващи влияние върху добива. Те са локализирани на втора хромозома в позиции 6 и 142 сМ (Таблица 16). Първият от тях се проявява и при двете нива на азотно третиране, докато вторият е детектиран само при ВА. QTL-ът в позиция 6 сМ обяснява 8,2% и 9,6% от варирането на признака при ниски и съответно високи нива на азотно торене. За разлика от предходния сезон, алелите допринасящи за повишаване на добива произхождат от линия В37.

##### 5.2.2. QTL за признака тегло на 1000 зърна

За TX3 при двете нива на азотно торене са установени различен брой QTL-и. При третиранията с ниско ниво на азотно торене са установени четири QTL-а локализиран върху три хромозоми (Таблица 16). Най-висок процент (21%) от варирането обяснява QTL-ът локализиран на хромозома 10 (51 cM). Посоката на знака на адитивния ефект на този QTL показва, че алелът свързан с повишаване на теглото на хиляда зърна произхожда от мутантната линия. При високи нива на азотно торене са установени шест QTL-и влияещи върху TX3 (Таблица 5-16). Най-голям процент ( над 16%) от вариацията при високи нива на азотно торене обяснява QTL-а на втора хромозома (59 cM)

### 5.2.3. QTL за признака влага в зърното

За разлика от останалите анализирани признаци в тази среда за ВЗ са картирани еднакъв брой QTL-и при ВА и НА. За всяко третиране са детектирани по шест QTL-а, оказващи влияние върху признака (Таблица 15). При третиранията с ниски нива на азотно торене, най-висок ефект върху признака оказват локусите, намиращи се на хромозома 2 (64 cM) и хромозома 5 (62 cM), определящи приблизително 34% процента от наблюдаваното вариране. В третиранията с високи нива на азотно торене, стабилно проявяващият се QTL на хромозома 2 (64 cM) обяснява най-голям процент от вариацията на признака (20%). Този QTL, заедно с картираният на хромозома 5 (47 cM), обясняват 34% от варианса на признака при ВА.. От посоката на адитивните ефекти се вижда, че и двете родителски линии допринасят алели за повишаване влажността на зърното, но за QTL-ите, с най-голям ефект върху експресията на признака в тази среда, алелите за по-висока влажност произхождат от линия В37.

### 5.2.4. QTL за признаците дни до цъфтеж на метлицата и дни до изсвлячане

През сезон 2011 г., локуси контролиращи изсвлячането не са детектирани, а трите QTL-а за цъфтеж на метлицата са установени само при третиранията с високи нива на азотно торене (Таблица 15). Два от локусите са локализиран в позиции 48 и 150 cM на десета хромозома, а третият в позиция 96 cM на шеста хромозома (Таблица 16). Двама QTL-а, картирани на десета хромозома обясняват по-голям процент от варирането на признака в сравнение с този на шеста хромозома. И при трите QTL-а, по-късният цъфтеж на метлицата е свързан с алелите на линия В37.

Таблица 5-16. QTL-и картирани при ниски и високи нива на азотно торене в сезон ГД11

|    | Признак | Хромоз | cM  | Ляв Маркер     | Десен Маркер    | LOD   | ПВО   | Адит. Ефект |
|----|---------|--------|-----|----------------|-----------------|-------|-------|-------------|
|    | ДЗ      | 2      | 6   | m376           | phi96100        | 2,67  | 8,25  | 0,29        |
|    | TX3     | 2      | 445 | HbrMPT87_B37   | HbrMFG87_B37    | 4,60  | 9,59  | 0,32        |
|    | TX3     | 5      | 34  | m107           | 113             | 3,67  | 8,18  | 0,29        |
|    | TX3     | 5      | 142 | HbrMFC112_XM87 | bngl278         | 3,72  | 7,59  | -0,28       |
|    | TX3     | 10     | 51  | m189           | m193            | 9,60  | 21,37 | -0,46       |
| НА | ВЗ      | 2      | 64  | IDP3972_XM87   | IDP2388         | 10,32 | 17,74 | 0,42        |
|    | ВЗ      | 3      | 109 | m133           | m38             | 3,76  | 6,31  | -0,25       |
|    | ВЗ      | 4      | 138 | m116           | bngl589         | 3,72  | 5,83  | 0,24        |
|    | ВЗ      | 5      | 62  | HbrMFG140_B37  | ZmV1_MPT186_B37 | 9,62  | 16,53 | 0,42        |
|    | ВЗ      | 5      | 175 | HbrMFC68_B37   | phi128          | 6,02  | 9,58  | -0,32       |
|    | ВЗ      | 10     | 70  | phi050         | bngl1526        | 4,71  | 7,39  | -0,27       |

|    | Признак | Хромоз | сМ  | Ляв Маркер       | Десен Маркер     | LOD   | ПВО   | Адит. Ефект |
|----|---------|--------|-----|------------------|------------------|-------|-------|-------------|
|    | ВК      | 2      | 6   | m376             | phi96100         | 2,61  | 4,88  | 0,21        |
|    | ВК      | 5      | 155 | HbrMFC68_B37     | phi128           | 5,44  | 13,03 | -0,35       |
|    | ВК      | 6      | 86  | m326             | IDP8945          | 4,28  | 8,90  | 0,28        |
|    | ВК      | 10     | 42  | IDP2006          | phi059           | 11,74 | 26,23 | 0,48        |
|    | ВР      | 1      | 85  | m165             | IDP3976          | 2,77  | 23,73 | 0,47        |
|    | ВР      | 2      | 76  | ZmV1_MFC128_B37  | m385             | 6,24  | 16,22 | 0,39        |
|    | ВР      | 5      | 146 | m27              | HbrMFC68_B37     | 5,88  | 14,44 | -0,38       |
| ВА | ДЗ      | 2      | 6   | m376             | phi96100         | 3,48  | 9,61  | 0,31        |
|    | ДЗ      | 2      | 142 | bngl1138         | ZmV1_MFC164_XM87 | 2,76  | 7,94  | 0,29        |
|    | ТХЗ     | 2      | 59  | IDP3972_XM87     | IDP2388          | 8,95  | 16,27 | 0,40        |
|    | ТХЗ     | 2      | 149 | ZmV1_MFC164_XM87 | m112             | 8,69  | 15,72 | 0,41        |
|    | ТХЗ     | 4      | 5   | m207             | bngl1265         | 3,74  | 6,69  | -0,26       |
|    | ТХЗ     | 4      | 99  | dupssr28         | IDP1991          | 4,10  | 6,16  | -0,26       |
|    | ТХЗ     | 5      | 29  | m260             | m107             | 8,42  | 13,74 | 0,37        |
|    | ТХЗ     | 10     | 54  | m189             | m193             | 6,74  | 10,69 | -0,33       |
|    | ВЗ      | 1      | 145 | m264             | m190             | 2,72  | 6,04  | 0,24        |
|    | ВЗ      | 2      | 64  | IDP3972_XM87     | IDP2388          | 11,32 | 20,57 | 0,45        |
|    | ВЗ      | 4      | 138 | m116             | bngl589          | 3,76  | 6,10  | 0,25        |
|    | ВЗ      | 5      | 47  | phi008           | m123             | 7,87  | 14,67 | 0,39        |
|    | ВЗ      | 5      | 179 | m302             | HbrMFC81_B37     | 5,35  | 9,04  | -0,32       |
|    | ВЗ      | 10     | 71  | m164             | m359             | 5,12  | 8,33  | -0,29       |
|    | ДЦМ     | 6      | 94  | phi025           | bngl1732         | 2,77  | 8,47  | 0,29        |
|    | ДЦМ     | 10     | 48  | IDP2006          | phi059           | 3,40  | 10,02 | 0,32        |
|    | ДЦМ     | 10     | 150 | bngl1360         | m239             | 3,02  | 11,57 | 0,34        |
|    | ВК      | 2      | 132 | HbrMFC219_B37    | bngl1138         | 4,43  | 9,15  | 0,29        |
|    | ВК      | 5      | 157 | HbrMFC68_B37     | phi128           | 5,22  | 13,91 | -0,36       |
|    | ВК      | 6      | 95  | phi025           | bngl1732         | 2,62  | 5,34  | 0,22        |
|    | ВК      | 10     | 42  | IDP2006          | phi059           | 3,64  | 7,62  | 0,26        |
|    | ВК      | 10     | 68  | HbrMFG135_XM87   | IDP2384          | 3,62  | 7,24  | 0,25        |
|    | ВР      | 1      | 127 | IDP3976          | m264             | 2,63  | 6,18  | 0,24        |
|    | ВР      | 2      | 75  | ZmV1_MFC128_B37  | m385             | 6,75  | 17,07 | 0,40        |
|    | ВР      | 5      | 146 | m27              | HbrMFC68_B37     | 6,83  | 16,38 | -0,40       |

Хромоз – име на хромозома; сМ – позицията на QTL-а от началото на хромозомата в сМ; Ляв и Десен маркер - маркерите ограничаващи интервала; ПВО – процентът от вариацията обяснена от QTL-а; Адитивен Еф. - адитивен ефект на локуса. Отрицателните стойности показват че алелът повишаващ стойността на признака е наследен от ХМ-87-136, а положителните че е наследен от В37

#### 5.2.5. QTL за признаците височина на залагане кочана и височина на растението

За признака височина на залагане на кочана, при ниски нива на азотно торене в този сезон, са установени четири QTL-а, разположени на хромозоми 2, 5, 6 и 10 (Таблица 16). В позиция 42 сМ на хромозома 10, през 2011 г. е QTL, проявяващ се и при двете азотни третириания, който при НА обяснява най-голям процент от варирането (26%). При ниски нива на азотно торене за признака ВК е установен и QTL на втора хромозома (позиция 6 сМ), който се ко-локализира с QTL за ДЗ, картиран и при двете азотни третириания. Алелите свързани с повишаване на височината на залагане на кочана произхождат главно от линия В37. При ниски нива на азотно торене са установени три QTL-а контролиращи височината на растенията. Два от тях, локализирани върху хромозоми 2 и 5 (Таблица 16), съвпадат с локализацията на тези установени и при високо ниво на азот през този сезон.

## **6. Ко-локализация на QTL за различни фенотипни признаци при контрастни нива на азотно торене и различни години на полско изпитване**

В някои локуси се наблюдава ко-локализиране на QTL-и за различни признаци. Така на например, през 2010 г. и при двете нива на азотно торене, QTL-ът за признака ДЗ на пета хромозома е картиран в един и същ хромозомен район с локуси, контролиращи ВР, ВК и ВЗ. През 2011 г., при ниски нива на азотно торене, интервалите на QTL-и контролиращи признаците ДЗ и ВЗ в позиция 6 сМ на втора хромозома напълно се припокриват. На хромозома 2 и през двата сезона, с изключение на НА през 2011 г., където не е детектиран QTL контролиращ теглото на зърното в този район на хромозомата, се наблюдава ко-локализиране на QTL-и за признаците ВЗ и ТХЗ. Ко-локализацията на QTL-и контролиращи други фенотипни признаци с тези за добив зърно отразява приноса на тези признаци за формирането на добива зърно при изследваните условия на средата. Това се потвърждава и от факта, че същите признаци показват и от високата фенотипна корелация с добива зърно при съответните средови условия (Таблица 5).

## **7. Обсъждане на QTL анализа при ниски и високи нива на азотно торене в двете години на полско изпитване**

В настоящето изследване са установени общо 53 различни QTL-и, контролиращи седемте изследвани признака при двете условия на азотно торене. В повечето случаи при третиранията с високи нива на азотно торене са установени по-голям брой QTL-и. Тези наблюдения съответстват с резултатите получени от други автори (Gallais and Hirel 2007; Hirel et al 2001), съобщаващи по-голям брой детектирани локуси при третиранията с високи нива на азотно торене. От друга страна, Agrama et al., (1999) докладват по-голям брой QTL-и в третиранията с азотен дефицит. Като вероятна причина за тази разлика може да се посочи спецификата на картиращата популация използвана в настоящето изследване, чиито толерантен родител, мутантната линия ХМ87-136, въпреки по-високата си сухоустойчивост е селектирана за използване в стандартни агрономически условия включващи допълнително внасяне на азот в почвата. Докато в цитираната по-горе работа толерантният родител е избран след насочена селекция за подобряване ефективността на усвояване на азота.

Четири от детектираните QTL-и контролират добива зърно. През двата експериментални сезона в Горни Дъбник се наблюдава изява на различни локуси свързани с признака ДЗ. QTL-ът на хромозома 5, проявяващ се в ГД10 при двете нива на азотно торене е локализиран в хромозомен бин (bin) 5.07. И други автори съобщават QTL-и контролиращи елементи на добива зърно, при различни нива на азотно торене, в същият хромозомен район. Liu et al (2008) картират в този геномен сегмент стабилен (между азотните нива) QTL, контролиращ броя на зърната, а Ribaut et al.(2007) го свързват с броя на кочаните на растение при ниски нива на азотно торене. В изследването на Hirel et al. (2001) в този район се ко-локализируют множество QTL-и, оказващи благоприятен ефект върху усвояването на азота. Авторите обясняват този факт с наличието на ген за цитозолна глутамин синтетаза (*gln1-4*) в този хромозомен бин. Значението на този ген за ремобилизацията на азота и наливането на зърното е потвърдено с помощта на нокаут мутанти и трансгенни линии, свърх експресирани гена (Martin et al., 2006). Вторият хромозомен район свързан с добива зърно при ВА през 2010 г. е картиран в позиция 82 сМ на хромозома 10. В този интервал при високи нива на азотно торене, Ribaut et al. (2007) също установяват locus,

свързан с добива на зърно. Coque and Gallais (2007) установяват QTL благоприятстващ ремобилизацията на азота при оптимални условия. Във въпросния хромозомен участък е картиран и QTL контролиращ броя на аксиалните корени при високи нива на азот (Liu et al. 2008). В друго изследване в същия район на 5-та хромозома са картирани QTL-и влияещи върху теглото на зърното при ниски и броя на зърната при високи нива на азотно торене (Liu et al., 2012). Последният екип картира два мета-QTL-а, проявяващи се в едното или другото ниво на азотно торене в съседство на този интервал и допуска действието на три кандидат гена намиращи се в този участък на десета хромозома - GRMZM2G420801 (етиленов рецептор 2), GRMZM2G123633 (инвертазен ензим от клетъчната стена) и GRMZM2G075676 (серин карбоксипептидаза). През 2011 г., в настоящото изследване са установени други два QTL-а с влияние върху добива, единият от които е детектиран и при двете нива на азотно торене. Те се намират на втора хромозома в позиции 6 cM и 142 cM. Първият, попадащ в бин 2.03, се проявява независимо от азотното торене. Свързани с добива QTL-и в този регион са описани и от други автори. Agrama et al. (1999) детектират в бин 2.03 QTL за добив зърно, проявяващ се в условия на азотен дефицит, а Cai et al (2012) установяват такъв и при двете нива на азотно торене. От друга страна Hirel et al. (2001) картират в този участък locus свързан с по-ниско съдържание на  $\text{NO}_3$  в листата по време на вегетативния период, което, според техните резултати, е свързано с по-ниска стресоустойчивост. Другият QTL, контролиращ ДЗ, на втора хромозома (142) cM е картиран в хромозомен район за който има данни, че контролира добива зърно при ниски нива на азотно торене (Ribaut et al., 2007) или независимо от нивата на азот в почвата (Cai et al, 2012).

В настоящото изследване само през 2010 г. са картирани QTL-и, контролиращи времето до изсвлячане. И двата QTL-а са картирани в бин 10.07, в който и други автори описват локуси свързани с изсвлячането в условия на стрес (Ribaut et al. 1996). За цъфтежа на метлицата са установени четири локуса с достоверно ( $\text{LOD} > 2.5$ ) влияние при високи нива на азотно торене. Три от тях са картирани върху десета и един върху шеста хромозома. Последният се намира в район от хромозомата, в който Ribaut et al (2007) картират QTL за този признак при ниски нива на азотно торене. Два от QTL-ите на десета хромозома попадат в същият хромозомен район, в който се намират и QTL-ите, контролиращи изсвлячането. Този факт предполага, че вероятно в съответния хромозомен сегмент се намират един или повече гени контролиращи преминаването на растението от вегетативна към репродуктивна фаза. Точната локализация и евентуално клониране на тези гени може да се осъществи в бъдещи QTL анализи за фино картиране чрез създаване и използване на почти изогенни линии (NIL).

Голяма част от картираните QTL-и, свързани с височината на растенията, са разположени в идентични или близки интервали на тези, контролиращи височината на залагане на кочана. Интерес представляват локусите, картирани на хромозоми 1 и 5. На хромозома 1 QTL-ите свързани с тези признаци попадат в бин 1.03. В този участък от първа хромозома е локализиран генът кодиращ, експресиращата се в корените, глутамин синтетаза (Gln1-1). Значението на този ензим за натрупването на биомаса по време на вегетативния период е демонстрирано в изследването на Martin et al (2006). На пета хромозома са картирани QTL-и за признаците ВК и ВР, оказващи висок ефект върху тяхната изява при двете нива на азотно торене в двата сезона. Тези QTL-и се локализируют в бин 5.07, в който през сезон 2010 г. е детектиран и QTL, контролиращ добива зърно и при двете нива на азотно торене, което обяснява в известна степен високата корелация на ДЗ с двата признака.

За признака ВЗ в настоящото проучване са дефинирани 10 QTL-а, локализиращи върху шест от

хромозомите. Високите стойности на този признак могат да се дължат удължена фотосинтетична способност при стрес или на къснозрялост на генотипа в нормални условия (Bekavac et al. 1998). И в двата случая се наблюдава нарастване на теглото на зърното. В нашето изследване през 2011 г. се наблюдава висока и достоверна корелация между двата признака. В някои от хромозомните сегменти QTL-и за признаците ВЗ и ТХЗ се локализируют в голяма близост един до друг.

Теглото на хиляда зърна е признак пряко свързан с добива на зърно. Той е показателен за стреса по време на наливане на зърното след опрашването. На втора хромозома са картирани три QTLa за признака ТХЗ, разположени в различни хромозомни райони, два от които се съобщават и в други изследвания. QTL-ите картирани в позиции 59 сМ и 64 сМ са наблюдавани съответно при НА – ГД10 или при двете нива на азотно торене-ГД11. Маркерният интервал, който ги ограничава попада в бин 2.02. В него е описан QTL, който контролира този признак и от Hirel et al (2001) в условията с високо азотно торене, а в публикацията на Ribaut et al (2007) в този сегмент е дефиниран locus свързан с добив зърно при ниски нива на азотно торене. Освен това други автори (Cai et al, 2012) установяват в същия хромозомен район QTL свързан с височината на залагане на кочана. Вторият интервал се локализира в бин 2.05, в който последният екип съобщава QTL за брой на зърната. Други два QTL-a за тегло на хиляда зърна, проявяващи се само при третирания ВА, са картирани в участъци на четвърта хромозома – бин 4.05 и 4.08. В първия бин Hirel et al (2001) също описват locus контролиращ този признак, а във втория е описана ко-локализация на QTL-и за няколко признака, ДЗ, ВР, брой дни между цъфтежа на двете съцветия и хлорофилна концентрация в листата в условия на азотен дефицит (Ribaut et al., 2007). От картираните на пета хромозома 4 QTL-a контролиращи теглото на хиляда зърна, два (31 и 34 сМ) попадат един и същи маркерен интервал (бин 5.03). Първият от тях се проявя в двете нива на азотно торене през 2010 а втория само при ниски нива през 2011 г.. Останалите се проявяват при ниски нива на азотно торене през 2011 г. (позиция 142 сМ – бин – 5.05) или при високи нива на азотно торене през същата година (позиция 29 – бин 5.02). В първия хромозомен сегмент Hirel et al, (2001) намират QTL свързан със способността на растенията да запасяват нитрати в листата, която показва положителна корелация с теглото на хиляда зърна. Авторите обясняват тази корелация с хипотезата, че натрупаните нитрати във вакуолите на листните клетки по време на вегетативната фаза се използват като депо за азот, по време на репродуктивната фаза, забавяйки деградацията на хлорофила и стареенето на листната маса, което осигурява удължен фотосинтетичен период за наливане на зърното. В същия хромозомен бин, те установяват и QTL-и контролиращи активността на глутамин синтетазата. На десета хромозома са картирани четири QTL-a за признак а ТХЗ, попадащи в три маркерни интервала. Двата QTL-a проявяващи се през 2010 се намират в различни хромозомни райони и се експресират при различни азотни нива. Този, проявяващ се в третирания с НА (72 сМ) се локализира бин 10.04, а QTL-ът картиран в третирания с висок азот (91 сМ) в бин 10.05. В първия сегмент в литературата са описани локуси за този признак при високи и ниски нива на азотно торене (Ribaut et al., 2007; Cai et al., 2012). Вторият locus на десета хромозома, обясняващ 20% от вариацията на признака при третирания с ВА се намира участък от генома в който Cai et al (2012) откриват QTL за ТХЗ при ниски нива на азот. Най-голям интерес представлява QTL-ът на 10 хромозома (51 сМ) картиран при ниски нива на азотно торене през 2011 г., който обяснява над 21% от варирането на признака при тези условия. Този QTL се локализира в хромозомен район, в който Liu et al.(2011) дефинират мета-QTL за същия признак проявяващ се както при ниски, така и високи нива на азотно торене. Въпреки слабите или незначителни корелации между ТХЗ и ДЗ, анализът на графично представените резултати

от картирането показва припокриване на интервалите на QTL-и за двата признака на хромозома две ГД11 – ВА. Подобно припокриване може да се дължи на близко разположени гени контролиращи двата признака или на плейотропни взаимодействия. Подобно клъстериране на QTL-и за агрономически важни признаци улеснява маркер-асистираната селекция, тъй като наслагването им в един и същи геном се улеснява от ниската честота на рекомбинация между тях.

Потенциалната приложимост на QTL-ите картирани в настоящото изследване за целите на селекцията, се подчертава както от сравнително високият процент на вариране обяснен от тези QTL-и, така и от потвърждението на тяхната роля в изследвания на други автори.

## 8. Оценка на взаимодействието на QTL с условията на средата

Изявата на количествените признаци може силно да варира в следствие на взаимодействието на генотипа със средата. Определянето на стабилността на проявлението на даден QTL между няколко среди (локации и години на извеждане на опита) е важна предпоставка за практическото му приложение. Един от начините да се детектират такива локуси е чрез изследване и сравнение на изявата на QTL-ите във всяка отделна среда. Този подход, обаче не може да даде точна оценка за величината на взаимодействието на QTL със среда (QTL x E). Съвместния анализ на данните за даден признак от няколко средови условия предоставя по-добра възможност за детекция на стабилно изявяващи се QTL-и и определяне на генетичния и средови компоненти влияещи върху изявата им. Определянето на стабилно проявяващи се QTL-и между средите се базира на оценка логаритъма на правдоподобие (LOD-A) на адитивния (генетичен) ефект на локуса и това на взаимодействието му със средата (LOD-A.E). В настоящото изследване като стабилно проявяващи се QTL-и са дефинирани тези, показващи LOD-A.E стойност по-ниска от 2,5.

При този анализ са установени 39 QTL-а (Таблица 17), контролиращи изследваните признаци при ниски и 44 QTL-а (Таблица 18) при високи нива на азотно торене. Само осем от тези локуси показват достоверно взаимодействие със средата. Петнадесет от детектираните QTL-и се проявяват специфично при ниски нива на азотно торене, двадесет и четири са установени и при двете нива на фактора, а 35 се проявяват специфично при високи нива на азотно торене. При съвместния анализ са открити и нови QTL-и, които не се проявяват в индивидуалния анализ на двата сезона.

Картираните стабилни QTL-и могат да бъдат включени в подпомогнати от маркери селекционни програми, насочени към повишаване екологичната стабилност на добива. Адаптивните QTL-и, проявяващи се специфично при ниски нива на азотно торене, могат да бъдат интегрирани в селекционни програми насочени към ниско потребление на азот от растението и към постигане на високи добиви при азотен дефицит.

Таблица 5-17 Оценка на взаимодействието QTL x E за изследваните признаци при ниски нива на азотно торене

|     | Хромоз | cM  | Ляв Маркер   | Десен Маркер | LOD  | LOD-A | LOD-A.E | ПВО  | Адит еф |
|-----|--------|-----|--------------|--------------|------|-------|---------|------|---------|
| ДЗ  | 2      | 6   | m376         | phi96100     | 2.68 | 1.29  | 1.39    | 4.13 | 0.14    |
| ДЗ  | 5      | 165 | HbrMFC68_B37 | phi128       | 4.09 | 3.59  | 0.50    | 5.63 | -0.23   |
| ДЗ  | 6      | 18  | bngl1371     | HbrMFC97_B37 | 2.76 | 2.22  | 0.54    | 3.89 | -0.18   |
| ДЦМ | 10     | 134 | umc1196      | bngl1839     | 4.02 | 3.50  | 0.52    | 5.96 | 0.23    |
| ДИ  | 10     | 133 | umc1196      | bngl1839     | 5.39 | 5.28  | 0.10    | 8.45 | 0.29    |
| ВК  | 1      | 164 | m264         | m190         | 8.99 | 7.61  | 1.38    | 8.79 | 0.25    |

|     | Хромоз | сМ  | Ляв Маркер      | Десен Маркер    | LOD   | LOD-A | LOD-A.E | ПБО   | Адит еф |
|-----|--------|-----|-----------------|-----------------|-------|-------|---------|-------|---------|
| BK  | 2      | 6   | m376            | phi96100        | 2.63  | 1.67  | 0.96    | 2.53  | 0.11    |
| BK  | 4      | 90  | umc1194         | dupssr28        | 4.61  | 4.19  | 0.42    | 3.97  | 0.18    |
| BK  | 5      | 155 | HbrMFC68_B37    | phi128          | 20.79 | 19.94 | 0.85    | 22.31 | -0.44   |
| BK  | 6      | 87  | m326            | IDP8945         | 4.26  | 2.31  | 1.95    | 4.17  | 0.14    |
| BK  | 6      | 101 | m183            | IDP3956         | 4.21  | 1.94  | 2.28    | 3.85  | 0.12    |
| BK  | 10     | 43  | IDP2006         | phi059          | 13.11 | 11.45 | 1.65    | 14.30 | 0.31    |
| BP  | 1      | 131 | IDP3976         | m264            | 6.11  | 5.89  | 0.22    | 5.74  | 0.23    |
| BP  | 2      | 75  | ZmV1_MFC128_B37 | m385            | 7.32  | 6.82  | 0.50    | 8.00  | 0.25    |
| BP  | 2      | 138 | HbrMFC219_B37   | bngl1138        | 5.68  | 5.33  | 0.35    | 5.33  | 0.23    |
| BP  | 5      | 146 | m27             | HbrMFC68_B37    | 7.20  | 6.84  | 0.36    | 8.18  | -0.26   |
| BP  | 5      | 176 | m302            | HbrMFC81_B37    | 12.01 | 9.38  | 2.63    | 11.94 | -0.31   |
| BP  | 6      | 73  | m228            | m326            | 3.79  | 3.67  | 0.12    | 3.43  | 0.18    |
| BP  | 8      | 103 | phi080          | phi233376       | 5.76  | 5.18  | 0.57    | 5.35  | -0.22   |
| BP  | 10     | 42  | IDP2006         | phi059          | 2.95  | 2.94  | 0.01    | 2.85  | 0.16    |
| B3  | 1      | 148 | m264            | m190            | 4.75  | 4.72  | 0.03    | 4.15  | 0.20    |
| B3  | 2      | 64  | IDP3972_XM87    | IDP2388         | 17.63 | 17.23 | 0.40    | 17.01 | 0.41    |
| B3  | 2      | 383 | HbrMPT87_B37    | HbrMFG87_B37    | 2.60  | 2.46  | 0.14    | 2.08  | -0.16   |
| B3  | 3      | 110 | m133            | m38             | 4.72  | 4.14  | 0.58    | 3.89  | -0.19   |
| B3  | 4      | 78  | umc1194         | dupssr28        | 3.33  | 3.21  | 0.12    | 2.68  | -0.16   |
| B3  | 4      | 138 | m116            | bngl589         | 7.74  | 7.71  | 0.02    | 7.07  | 0.26    |
| B3  | 5      | 40  | phi113          | phi008          | 3.13  | 2.55  | 0.58    | 3.10  | 0.15    |
| B3  | 5      | 63  | HbrMFG140_B37   | ZmV1_MPT186_B37 | 9.83  | 6.34  | 3.50    | 8.43  | 0.24    |
| B3  | 5      | 175 | HbrMFC68_B37    | phi128          | 6.03  | 2.60  | 3.43    | 4.93  | -0.15   |
| B3  | 10     | 70  | phi050          | bngl1526        | 5.61  | 4.69  | 0.92    | 4.66  | -0.20   |
| TX3 | 1      | 280 | umc1122         | m349            | 3.77  | 3.74  | 0.03    | 3.68  | 0.20    |
| TX3 | 2      | 62  | IDP3972_XM87    | IDP2388         | 5.97  | 5.72  | 0.25    | 6.60  | 0.25    |
| TX3 | 2      | 445 | HbrMPT87_B37    | HbrMFG87_B37    | 6.01  | 5.52  | 0.49    | 6.16  | 0.25    |
| TX3 | 4      | 10  | m207            | bnlg1265        | 3.25  | 3.22  | 0.03    | 3.42  | -0.19   |
| TX3 | 5      | 32  | m107            | phi113          | 10.02 | 9.92  | 0.10    | 11.29 | 0.33    |
| TX3 | 5      | 142 | HbrMFC112_XM87  | bngl278         | 3.79  | 2.02  | 1.77    | 3.80  | -0.15   |
| TX3 | 6      | 1   | m34             | ZmV1_MFC171_B37 | 2.55  | 2.20  | 0.36    | 2.63  | 0.15    |
| TX3 | 10     | 51  | m189            | m193            | 9.83  | 6.05  | 3.78    | 10.86 | -0.25   |
| TX3 | 10     | 72  | m164            | m359            | 7.26  | 5.54  | 1.72    | 8.55  | -0.24   |

Хромоз – номера на хромозомата върху която се намира локусът; Позиция – позиция на QTL-а от началото на хромозомата в сМ; Ляв Марк – ляв маркер ограничаващ интервала; Дес. Марк – десен маркер; LOD – за детектирания QTL; LOD-A - логаритъм на правдоподобие за адитивния ефект на локуса; LOD-A.E - логаритъм на правдоподобие за взаимодействието на локуса със средата

Таблица 5-18 Оценка на взаимодействието QTL x E за изследваните признаци при високи нива на азотно торене

|    | Хромоз | сМ  | Ляв Маркер   | Десен Маркер     | LOD  | LOD-A | LOD-A.E | ПБО   | Адит еф |
|----|--------|-----|--------------|------------------|------|-------|---------|-------|---------|
| ДЗ | 2      | 6   | m376         | phi96100         | 3.48 | 1.83  | 1.65    | 4.80  | 0.15    |
| ДЗ | 2      | 142 | bngl1138     | ZmV1_MFC164_XM87 | 3.71 | 3.53  | 0.19    | 4.72  | 0.21    |
| ДЗ | 5      | 166 | HbrMFC68_B37 | phi128           | 7.54 | 5.94  | 1.60    | 10.04 | -0.29   |
| ДЗ | 8      | 67  | bngl1065     | m334             | 2.59 | 2.48  | 0.11    | 3.21  | -0.18   |
| ДЗ | 10     | 85  | m51          | m177             | 3.86 | 0.19  | 3.66    | 4.84  | -0.05   |

|     | Хромоз | cM  | Ляв Маркер       | Десен Маркер   | LOD   | LOD-A | LOD-A.E | ПВО   | Адит еф |
|-----|--------|-----|------------------|----------------|-------|-------|---------|-------|---------|
| ДЦМ | 2      | 0   | m267             | m243           | 2.63  | 2.62  | 0.01    | 3.60  | 0.18    |
| ДЦМ | 6      | 91  | phi025           | bngl1732       | 3.93  | 3.83  | 0.10    | 5.61  | 0.23    |
| ДЦМ | 10     | 48  | IDP2006          | phi059         | 3.78  | 3.12  | 0.66    | 5.65  | 0.21    |
| ДЦМ | 10     | 134 | umc1196          | bngl1839       | 5.12  | 5.04  | 0.08    | 7.21  | 0.26    |
| ДИ  | 10     | 133 | umc1196          | bngl1839       | 5.00  | 4.95  | 0.05    | 7.76  | 0.27    |
| ВК  | 1      | 174 | ZmV1_MFC57_XM87  | HbrMPA119_XM87 | 3.32  | 2.66  | 0.66    | 3.89  | 0.16    |
| ВК  | 2      | 133 | HbrMFC219_B37    | bngl1138       | 5.38  | 4.71  | 0.67    | 5.21  | 0.21    |
| ВК  | 5      | 156 | HbrMFC68_B37     | phi128         | 14.16 | 14.07 | 0.09    | 16.55 | -0.39   |
| ВК  | 6      | 80  | m326             | IDP8945        | 4.68  | 4.67  | 0.01    | 4.94  | 0.21    |
| ВК  | 7      | 33  | phi069           | phi116         | 2.61  | 2.58  | 0.03    | 2.56  | -0.15   |
| ВК  | 10     | 42  | IDP2006          | phi059         | 4.97  | 4.64  | 0.33    | 4.95  | 0.21    |
| ВК  | 10     | 68  | HbrMFG135_XM87   | IDP2384        | 3.86  | 2.76  | 1.10    | 3.78  | 0.16    |
| ВР  | 1      | 134 | m264             | m190           | 6.02  | 5.86  | 0.16    | 5.64  | 0.23    |
| ВР  | 2      | 3   | m267             | m243           | 2.53  | 2.43  | 0.10    | 2.50  | 0.15    |
| ВР  | 2      | 74  | ZmV1_MFC128_B37  | m385           | 8.47  | 8.12  | 0.35    | 8.84  | 0.27    |
| ВР  | 2      | 137 | HbrMFC219_B37    | bngl1138       | 5.86  | 5.53  | 0.33    | 5.60  | 0.23    |
| ВР  | 5      | 168 | HbrMFC68_B37     | phi128         | 10.38 | 7.75  | 2.63    | 10.11 | -0.28   |
| ВР  | 6      | 73  | m228             | m326           | 3.99  | 3.90  | 0.09    | 3.64  | 0.19    |
| ВР  | 8      | 103 | phi080           | phi233376      | 6.14  | 5.70  | 0.44    | 5.86  | -0.23   |
| ВР  | 10     | 42  | IDP2006          | phi059         | 3.55  | 3.55  | 0.00    | 3.33  | 0.18    |
| В3  | 1      | 149 | m264             | m190           | 5.31  | 5.28  | 0.03    | 4.90  | 0.22    |
| В3  | 2      | 64  | IDP3972_XM87     | IDP2388        | 16.96 | 15.96 | 1.00    | 17.15 | 0.41    |
| В3  | 3      | 116 | m38              | IDP9111        | 3.40  | 3.31  | 0.09    | 2.94  | -0.17   |
| В3  | 4      | 78  | umc1194          | dupssr28       | 3.33  | 3.27  | 0.06    | 2.96  | -0.17   |
| В3  | 4      | 138 | m116             | bngl589        | 7.07  | 6.96  | 0.11    | 6.87  | 0.26    |
| В3  | 5      | 41  | phi113           | phi008         | 9.60  | 8.45  | 1.15    | 8.63  | 0.28    |
| В3  | 5      | 70  | ZmV1_MPT186_B37  | m230           | 3.01  | 2.98  | 0.03    | 2.92  | 0.17    |
| В3  | 5      | 179 | m302             | HbrMFC81_B37   | 8.16  | 7.69  | 0.47    | 7.77  | -0.29   |
| В3  | 9      | 105 | m318             | m226           | 3.20  | 3.18  | 0.02    | 3.09  | 0.18    |
| В3  | 10     | 71  | m164             | m359           | 5.93  | 4.73  | 1.20    | 5.12  | -0.21   |
| ТХ3 | 2      | 61  | IDP3972_XM87     | IDP2388        | 12.72 | 12.05 | 0.67    | 10.45 | 0.32    |
| ТХ3 | 2      | 146 | ZmV1_MFC164_XM87 | m112           | 9.23  | 6.76  | 2.47    | 7.15  | 0.24    |
| ТХ3 | 2      | 445 | HbrMPT87_B37     | HbrMFG87_B37   | 4.61  | 4.48  | 0.14    | 3.95  | 0.19    |
| ТХ3 | 4      | 2   | m207             | bngl1265       | 6.97  | 6.90  | 0.07    | 5.57  | -0.24   |
| ТХ3 | 4      | 97  | dupssr28         | IDP1991        | 5.41  | 4.91  | 0.51    | 4.10  | -0.20   |
| ТХ3 | 5      | 30  | m260             | m107           | 15.75 | 15.58 | 0.17    | 13.72 | 0.37    |
| ТХ3 | 9      | 275 | m227             | umc1277        | 2.58  | 2.57  | 0.01    | 1.87  | -0.15   |
| ТХ3 | 10     | 52  | m189             | m193           | 7.88  | 6.63  | 1.25    | 6.00  | -0.23   |
| ТХ3 | 10     | 91  | m177             | HbrMFG89_XM87  | 9.76  | 8.14  | 1.62    | 9.41  | -0.25   |

Хромоз – номера на хромозомата върху която се намира локусът; Позиция – позиция на QTL-а от началото на хромозомата в cM; Ляв Марк – ляв маркер ограничаващ интервала; Дес. Марк – десен маркер; LOD – за детектирания QTL; LOD-A - логаритъм на правдоподобие за адитивния ефект на локуса; LOD-A.E - логаритъм на правдоподобие за взаимодействието на локуса със средата

## Изводи

1. Установено е високо достоверно влияние на главните фактори: ниво на азотно торене, напояване и взаимодействието им върху експресията на 7 фенотипни признака за всички локации и сезони на полските опити (с изключение на признака дни до изсвлячане (ДИ) за Садово през 2010 г. по технически причини) .
2. Установено е достоверно влияние на генотипа върху изследваните 7 фенотипни признаци при всички третираня, локации и години на изпитване (с изключение добив зърно (ДЗ), за Садово, 2010 г. по технически причини).
3. Установено е достоверно взаимодействие между генотипа и нивото на азотно торене за признака добив зърно (ДЗ) и за някои морфо-физиологични признаци при всички третираня, локации и години на изпитване.
4. Установено е достоверно взаимодействие между генотипа и напояването само за признака влага в зърното (ВЗ) в двата сезона на полско изпитване в Горни Дъбник и за признака тегло на 1000 зърна през 2011 г.
5. Оптимизиран е метод за комбиниран мултиплексен анализ на SSR и IDP маркери на капиларен секвенатор.
6. Конструирана е интегрирана генетична карта на дихаплоидна популация, получена от кръстоска между изходната инбредна линия В37 и мутантната инбредна линия ХМ-87-136. Картата е с обща дължина 2329 сМ и съдържа общо 196 полиморфни локуси, от които 67 SSR, 17 IDP, 33 MITE-TD и 79 SNP маркери.
7. Картирани са общо 59 QTL-а, контролиращи експресията на седем количествени признаци в дихаплоидната популация при две нива на азотно торене и двугодишно полско изпитване. Установени са петнадесет специфични за ниски нива на азотно торене QTL-и, стабилно експресиращи се и при двете години на полско изпитване.
8. Картираните QTL-и, проявяващи се стабилно при две нива на азотно торене и двугодишно полско изпитване могат да бъдат включени в подпомогнати от маркери селекционни програми насочени към повишаване екологичната стабилност на добива. Адаптивните QTL-и, за които се установява специфично проявление при ниските нива на азот но торене, да се използват в селекционни програми насочени към ниско потребление на азот от растението и към постигане на високи добиви при азотен дефицит.

## **Справка за приносите**

### **1. Приноси със значение за науката**

- 1.1. За първи път се изследва и поддържа оригинална дихаплоидна популация царевица, създадена чрез индуциране на хаплоидия в  $F_1$  кръстоска на елитна мутантна инбредна линия ХМ87-136, получена чрез химически мутагенезис последван от РРМС, с нейната изходна инбредна елитна линия В37. Съществена особеност е тясната генетична основа на създадената дихаплоидна популация с фиксирани рекомбинации на изходни гени от линия В37 и мутантни гени на мутантната линия ХМ87-136. Промените в експресията на количествените признаци са резултат от взаимодействие между изходни и мутантни гени. Използването на такъв вид популация позволява да се картират „мутантни” QTL-и, контролиращи количествени признаци и прилагането им в традиционната и в мутационната селекция на царевицата. В изследваната дихаплоидна популация е доказана сегрегация на локуси, контролиращи количествени признаци със стопанско значение.
- 1.2. За първи път е конструирана интегрирана генетична карта на дихаплоидна популация, получена от кръстоска между изходната инбредна линия В37 и мутантната инбредна линия ХМ87-136 (химически мутант в В37).
- 1.3. За първи път са картирани „мутантни” QTL-и, контролиращи добива зърно и други стопански важни количествени признаци, които са резултат от рекомбинация между мутантни и изходни гени в дихаплоидна популация царевица.

### **2. Приноси с научно-приложен характер**

- 2.1. За първи път при царевицата е оптимизиран метод за комбиниран мултиплексен анализ на SSR и IDP маркери на капиларен секвенатор, който позволява съществено намаление на разходите по генотипиране на дихаплоидната популация.
- 2.2. За първи път в България е адаптиран метод за генотипиране на TD-AFLP полиморфизми на капиларен секвенатор за две MITE транспозонни фамилии (Hbr и ZmV1). Практическата приложимост на метода е демонстрирана чрез картиране на полиморфните фрагменти в дихаплоидна популация царевица.
- 2.3. Стабилно проявяващите се при контрастни нива на азотно торене QTL-и могат да се използват . в подпомогнати от маркери селекционни програми, насочени към повишаване екологичната стабилност на добива, а адаптивните показващи специфично проявление при ниски нива на азот- в селекционни програми, насочени към ниско потребление на азот и постигане на високи добиви при азотен дефицит.

**Списък с публикации:**

- Tsonev, S, E Todorovska, V Avramova, S Kolev, N Abu-Mhadi, and NK Christov. 2009. “Genomics Assisted Improvement of Drought Tolerance in Maize: QTL Approaches.” *Biotechnol Biotechnol Eq* 23: 1410–13.
- Tsonev, S., M. Velichkova, E. Todorovska, V. Avramova, and NK Christov. 2013. ‘Development of Multiplex Primer Sets for Cost Efficient SSR Genotyping of Maize (*Zea Mays*) Mapping Populations on a Capillary Sequencer’. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19 (2): 5–9.
- Tsonev, S., E Todorovska, and NK Christov. 2015. “A versatile Fluorescence-based Multiplexing Assay for Combined Genotyping of SSR and Insertion-Deletion Polymorphism (IDP) Markers on Capillary Electrophoresis Systems”. *Bulgarian Journal of Agricultural Science (In press)*