



**А Г Р А Р Е Н У Н И В Е Р С И Т Е Т – П Л О В Д И В**  
**Ц Е Н Т Ъ Р З А Н А У Ч Н И И З С Л Е Д В А Н И Я , Т Р А Н С Ф Е Р Н А Т Е Х Н О Л О Г И И И З А Щ И Т А**  
**Н А И Н Т Е Л Е К Т У А Л Н А Т А С О Б С Т В Е Н О С Т**

Пловдив 4000; бул. Менделеев № 12; e-mail: [nic\\_au\\_plovdiv@abv.bg](mailto:nic_au_plovdiv@abv.bg)

Тел. +359/32/654420; 654427, [www.au-plovdiv.bg](http://www.au-plovdiv.bg)

**A G R I C U L T U R A L U N I V E R S I T Y - P L O V D I V**

Bulgaria, 4000 Plovdiv, 12 Mendleev Str., e-mail: [nic\\_au\\_plovdiv@abv.bg](mailto:nic_au_plovdiv@abv.bg)

Tel. +359/32/654420; 654427, [www.au-plovdiv.bg](http://www.au-plovdiv.bg)

## **Информационен лист**

за научните проекти, финансирани целево от държавния бюджет

1. Тема на проекта: *“Нови подходи за устойчиво използване и опазване на някои диви видове от сем. Fabaceae в района на Природен Парк Странджа и техния биологичен потенциал, интегриран в земеделието”*.

2. Научен колектив:

Научен ръководител: Проф. д-р Нуреттин Тахсин, АУ, катедра „Растениевъдство“.

Членове:

1. Гл. ас. д-р Марияна Петкова, АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".

2. Гл. ас. д-р Славя Петрова АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".

3. Ас д-р Величка Спасова- Апостолова, АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".

4. Иван Ивайлов Иванов, студент от специалност Агрономство – „Растителни биотехнологии“, III курс, фак. № 279 Б.

5. Гл. ас. д-р Мария Събева, ИРГР „К. Малков,, – Садово.

6. Доц. д-р Катя Узунджалиева, ИРГР „К. Малков,, – Садово.

Консултант: 1. Доц. д-р Сийка Ангелова- ИРГР „К. Малков,, – Садово.

3. Цел и задачи на проекта:

### **Основни цели:**

1. Ограничаване и предотвратяване на причините за намаляване или загубване на популациите от изследваните диви видове *Cicer monbretii* Jaub. & Spach, *Lupinus albus* L., *Vicia sativa complex/Vicia incisa*, във връзка с опазване на техните находища.

2. Създаване на *ex situ* колекция, необходима за селекционно-подобрителна дейност и въвеждане в култура.

## Цели и задачи за втората финансова година:

1. Мониторинг на находищата на диви видове
2. Колекциониране на семена
3. Размножаване
4. Метагеномен анализ на почвени проби
5. Молекулярно-генетично типирание и идентификация на изолираните щамове азот-фиксиращи бактерии изолирани от *ризосферата на редки диви видове от сем. Fabaceae*.
6. Биохимична оценка на зелената маса и семената
7. ДНК базирани маркери за изследване на популационната структура на зародишна палзма от български културни и диворастящи видове - *Cicer monbretii*.
8. Изготвяне на междинен отчет

## II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1.1. Експедиционно обследване по маршрутен метод

- ✓ Съгласно работната програма, са проведени три експедиции: (26-28 април; 14-17 юни и 04-08 юли 2022 г) по маршрут:
  - Пловдив- Бургас- Малко Търново- местност „Мишкова Нива“- с. Бръшлян- с. Младежко –с. Ясна поляна- Царево - с. Варвара- местност «Големият Пазвлак» с. Варвара- Резово- Синеморец- Ахтопол- с. Бродилово- с. Кондолово- Граматиково-Визица- Евренозово – Варовник-Бургас- Пловдив.
- ✓ Кратка екогеографска характеристика:
  - надморска височина и съпътстващи видове
  - състояние на растителния хабитат и заплахи.
- ✓ Почвени проби за химичен и микробиологичен анализ

### 1.2. Измерване на съотношението гъби-бактерии в почвата с MicroBIOMETER®

Почвените микроби отделят екзополisahариди и други метаболити, които свързват неживите почвени частици една към друга и към себе си. В анализа microBIOMETER® (Prolific Earth Sciences, Inc., Монгтомъри, Ню Йорк, САЩ), малка проба от почва се поставя в епруветка с реактивна сол и се смесва с върхове. Това освобождава микроби, свързани с или в почвените частици, и ги суспендира в разтвор, докато почвените частици се утаяват на дъното на тръбата. Микробите, които остават суспендирани в соления разтвор, се вземат проби чрез поставяне на капки от разтвора върху тестова карта, която след това се сканира с помощта на приложение за камера. Приложението измерва интензитета на цвета на мястото, където са поставени пробни капки, и полученият цвят се сравнява с цветен фон, заобикалящ областта на пробите върху тестовата карта. Смята се, че цветът, генериран от взетите капки, измерва плътността на микробните клетки в пробата по силата на цветността, поета от самите почвени микроорганизми, (Prolific Earth Sciences, Inc., 2020 г.).

### 1.3. Извличане на ДНК от почвен геном

Тоталната геномна ДНК на е извлечена от ризосферната почва по метода СТАВ/SDS в етапа на масов цъфтеж на растенията грах. Концентрацията и чистотата на ДНК се наблюдават върху 1% агарозни гелове. Според концентрацията, ДНК се разрежда до 1 ng/μL с помощта на стерилна вода. Смесете същия обем от 1 × зареждащ буфер (съдържащ SYB зелен) с PCR продукти и извършете електрофореза върху 2% агарозен гел за откриване. Пробите бяха изпратени за анализ в Novogene (Кеймбридж, Обединеното кралство), където се използват за генериране на библиотеки от ампликони с праймери, предназначени за идентифициране на прокариотни микроорганизми. Секвенирането се извършва на платформата Illumina MiSeq PE 300. Получават се необработени данни за секвениране на FASTQ от около 100 000 последователности на проби. Биоинформатичният анализ на секвенираните ампликони се извършва на платформите MG-RAST и QIIME (Caporaso et al., 2010; Keegan et al., 2016).

#### 1.4. Протокол за подготовка на библиотека и метагеномно секвениране

Метагеномният анализ на общите последователности в пробата за разкриване на състава на микробната общност в тази конкретна проба, или чрез целенасочен подход чрез целева метагеномика, беше извършен с платформата Illumina MiSeq PE 300 в Novogene (Кеймбридж, Обединеното кралство). При подхода определена подгрупа в рамките на микробната общност е насочена от първи PCR усилващи последователности в рамките на целевата група чрез ген на баркод, уникален за тази субпопулация, преди секвенирането на тези ампликони. Използвани са праймери за амплификация на хиперпроменливата област V3–V4 на 16S rDNA гена на Eubacteria и Archaea.

FASTQ последователностите бяха филтрирани, за да се премахнат химерни последователности и единични елементи, за да се получат предварително обработени четения, които след това бяха групирани, за да се получат OTU. Допълнителна таксономична анотация на получените прокариотни OTUs беше направена с помощта на инструменти QIIME и MG-RAST (Caporaso, 2010; Keegan et al., 2016).

#### 1.5. ДНК базирани маркери за изследване на популационната структура на зародишна палзма от български културни и диворастващи видове - *Cicer monbretii*.

##### 1. Изолиране на ДНК

За изолиране на ДНК са използвани млади листа от нахут, фасул и лупина, стрити с помощта течен азот. Екстракцията на ДНК е извършена със СТАВ протокол. Концентрациите на пробите са определяни на агарозен гел чрез сравняване със стандартни концентрации на ламбда ДНК (Thermo Scientific Life Sciences, Cat. No SD0011, Литва). Приготвени са четири концентрации: I. - 50 ng/μL, II - 20 ng/μL, III - 10 ng/μL и IV - 5 ng/μL от 300 ng/μL ламбда ДНК-разтвор, които да послужат за сравняване на концентрациите на изолираните ДНК-проби.

##### 2. PCR техники за генотипиране

Използвани са ISSR праймери от Denduangboripant et al., 2010 и Andeden et al., 2013 и iPBS праймери проектирани от (Kalendar et al., 2010) (Таблица 1). PCR реакциите са проведени в 10 μL реакционна смес. Всяка реакционна смес съдържа 15 ng матрична ДНК, 1 μL от 10 x Green PCR buffer (Thermo Fisher Scientific), 1 μM праймер, 1 μL от 2 mM dNTP MIX (Thermo Fisher Scientific) и 0,1 μL от 5 U DreamTaq DNA полимераза (Thermo Fisher Scientific). PCR амплификациите са извършени при следните условия: начален етап на денатурация при 94°C за 2 min, последван от 35 цикъла при 95°C за 15 s., при 40-60°C (в зависимост от нуклеотидната последователност и Tm на праймерите) за 1 min и при 68°C за 1 min., последвано от окончателно удължаване от 72°C за 5 минути (Andeden et al., 2013).

##### 3. Използвани праймери

iPBS праймер	Нуклеотидна последователност	Температура на присъед.	Автори
2400	CCCCTCCTTCTAGCGCCA	60°C	Kalendar et al., 2010
2242	GCCCCATGGTGGGCGCCA		
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA		
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA		
2228	CATTGGCTCTTGATACCA		
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	55°C	
2249	AACCGACCTCTGATACCA		
2240	AACCTGGCTCAGATGCCA		
2221	ACCTAGCTCACGATGCCA		
2241	ACC TAG CTC ATC ATG CCA		
2229	CGACCTGTTCTGATACCA	40°C	
2243	AGT CAG GCT CTG TTA CCA		
2238	ACC TAG CTC ATG ATG CCA		
2386	CTGATCAACCCA		
2074	GCTCTGATACCA		
2276	ACCTCTGATACCA		
2277	GGCGATGATACCA		
2375	TCGCATCAACCA		
2272	GGCTCAGATGCCA		

2390	GCAACAACCCCA		
2394	GAG CCT AGG CCA		
<b>ISSR праймер</b>	<b>Нуклеотидна последователност</b>	<b>Температура на присъед.</b>	<b>Автори</b>
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	55°C	(Denduangboripant et al., 2010).
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC		(Andeden et al., 2013)
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT		
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC		
UBC826	ACACACACACACACACC		
UBC890	VHVTGTGTGTGTGTGTGT		

#### 4. Провеждане на електрофореза

Резултатите от PCR продуктите са визуализирани чрез електрофореза в 1,5 % агарозен гел (1x TAE), оцветен с SafeView (NBS Biologicals, UK) при 70 V. За сравнение на дължината на фрагментите е използван GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

### III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

#### 1. Експедиционно обследване

Научният екип, участващ в проекта, проведе три експедиции през 2022 г. При обследване на находищата от проучваните видовете първата експедиция, се проведена в края на април, когато обследваните видовете са във фаза масов цъфтеж и начало на бобообразуване. Второто обследване е извършено във фаза начало на узряване. При третата експедиция, обследването е проведено във фаза пълно узряване. Колекционирани са семена от двата вида - *Cicer montbretii* Jaub. & Spach, *Lupinus ssp* в количество съгласно разпоредбите на ПП Странджа. Взет е растителен материал от цариградския нахут за химичен анализ. Семена от вида *Vicia incisa* не са събрани.

Находището от *Cicer montbretii* Jaub. & Spach е потвърдено в Малко Търново, Граматиково, Индипасха, Бродилово (краят на селото, край коларски път). Находищата са в добро състояние, не се наблюдават дейности, които да ги застрашават.

С помощта на експертите от ПП Странджа е маркирано ново находище от *Cicer montbretii* Jaub. & Spach, *Lupinus ssp.*, в местност над село Бродилово, край поток с надморска височина от 92 метра. Находището може да се раздели на две части: първата част и само от цариградски нахут, а втората само от лупина. Находищата се намират в дъбова гора, върху излужена канелено-горска почва. Цариградският нахут е представен от единични растения и от групи с по 5, 10 и 20 растения, разпръснати по склона между потока и дъбовата гора, както и на открити места. Цветовете са от 2 до 5, рядко единични, в рехави гроздовидни съцветия в пазвите на листата. Бобът е гладък, широк, продълговат, кафяв, 3-4 семенен. Семената са кълбести, кафяви или черни.

Видът *Lupinus* е в близост до дъбова гора. Намира се на открито скалисто място с храсти от сем. *Oleaceae* (Маслиновите), *Phyllirea latifolia* (Вечно зелен храст). Видът е с височина на стъблото около 30 см, изправено, разклонено, покрито с бели власинки. Листата имат длановидна форма. Цветовете са последователно разположени, със бледосиня окраска. Бобът е продълговат, влакнест, прищипнат, с 4-6 семена. Семената са сплеснати, бели, гладки.

Основни съпътстващи видове в местонаходището от двата вида са *Sedum anglicum*, *Cancalis platycarpus* (Бабиница), *Aegilops cylindrica* (Цилиндрично диво жито), *Aegilops geniculata*, *Avena sp.*, *Synosurus echinatus*, *Trifolium angustifolium*, *Hypericum perforatum* (Жълт кантарион), *Althea rosea*, *Ajuga laxmannii*, *Therucium lamiifolium* – вид от червенана книга

Колекционирани са семена в количество, което ще позволи разработване на методология за ефективна кълняемост при нахута и лупината, с възможности за *ex situ* колекция и съхранение в ген банка и при възможност за химичен анализ.

#### 2. Изследване на физикохимични параметри на почвата от Мишкова нива

Изследвани са някои физикохимични параметри на почвите като рН и електропроводимост. Резултатът показва, че канелената горска почва от южния склон на Мишкова нива има средно киселинно рН, което най-вероятно се дължи на горска постеля от широколистни насаждения (предимно дъб) или на измиване на основни катиони от профила (Таблица 1) .

N	Физиологични параметри	Стойности
1	рН	6.04
2	Electrical conductivity, $\mu\text{S}/\text{cm}$	77

3	SR	6.35
4	SIR	10.25
5	NH <sub>4</sub>	39.1
6	NO <sub>3</sub>	20.2
7	Total N	59.3
8	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	3.5
9	K <sub>2</sub> O	60.7
10	Плесенни гъби:бактерии	0.7:1 (41%: 59%)

pH е важно не само за физиологията на микробните клетки, но и за наличността на хранителни вещества. Повечето микроорганизми растат в относително широк диапазон на pH, тяхната ензимна активност е най-висока в неутрална среда. При неутрално pH се активира активността на ензимите, върху процесите на навлизане на веществата в клетката и др. В този смисъл в изследваните почви от местообитанията на редки диви бобови култури те имат реакция, близка до неутралната и може да се очаква по-добро представяне на основните групи микроорганизми.

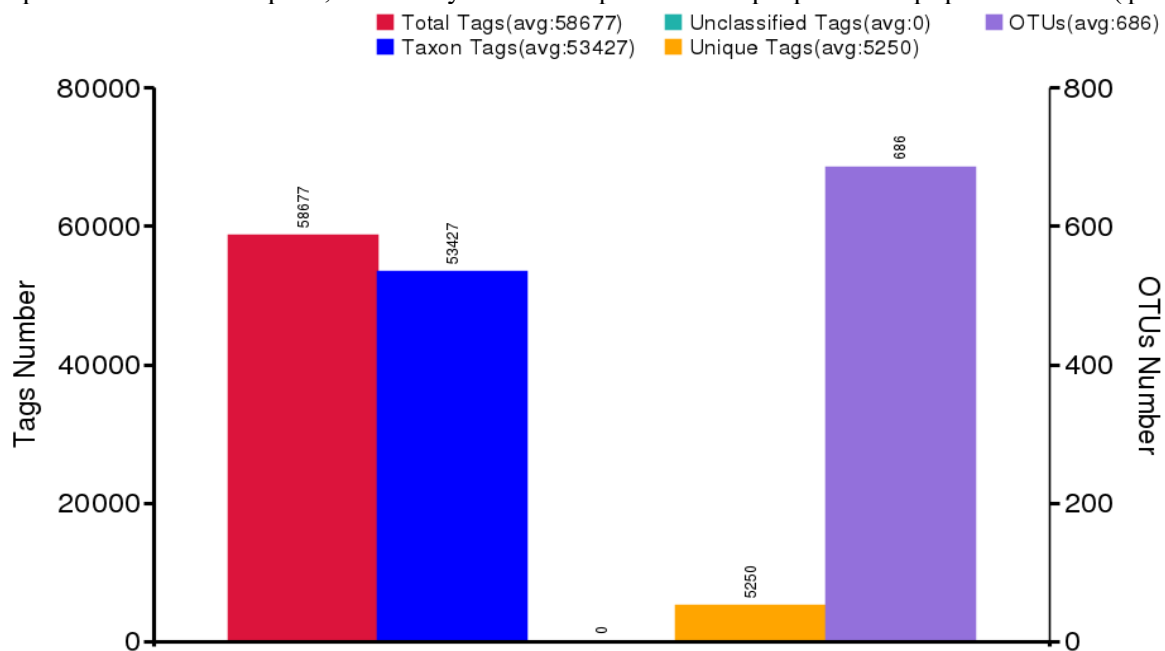
Измерването на електропроводимостта на почвата ни показва съдържанието на разтворими соли в почвата. Това е лесен начин за проследяване на движението на наличните форми на хранителни вещества в почвения профил и тяхната пространствена наличност за кореновата система на растението. Данните от настоящото изследване показват, че горската канелена почва от Мишкова нива има много ниска електропроводимост от 77  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

От агрохимичния анализ на почвените проби се установява, че общото съдържание на азот е средно високо в канелените горски почви със стойности 59,3 mg/1000 g почва. Амониевият азот е в ниска концентрация 39,1 mg/1000g почва, а нитратният азот е най-нисък 20,2 mg/1000g почва. Ризосферната почва на *S. montbretii* се характеризира с високо съдържание на фосфор, измерено като P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg/1000 g почва и повишени стойности на наличните форми на K<sub>2</sub>O в стойности от 60,7 mg/ 1000 g почва.

### 3. Метагеномен анализ на бактериалните съобщества на почва на Мишкова нива

Общата ДНК се изолира от почвата и присъствието на 16S rRNA гена се потвърждава чрез амплификация с универсални праймери. Общо необработени прочитания на последователността (сдвоен край) от 196 595 със средна дължина на последователността от 151 bp всяко бяха получени от Illumina MiSeq™ секвенсер.

Общо 58677 необработени маркера бяха генерирани от секвенирането на пробата с Illumina Miseq. След контрола на качеството останаха общо 53423 маркера за таксони. След това, след отстраняването на химерите, бяха получени 686 ефективни маркера за генериране на OTU (фиг. 3).

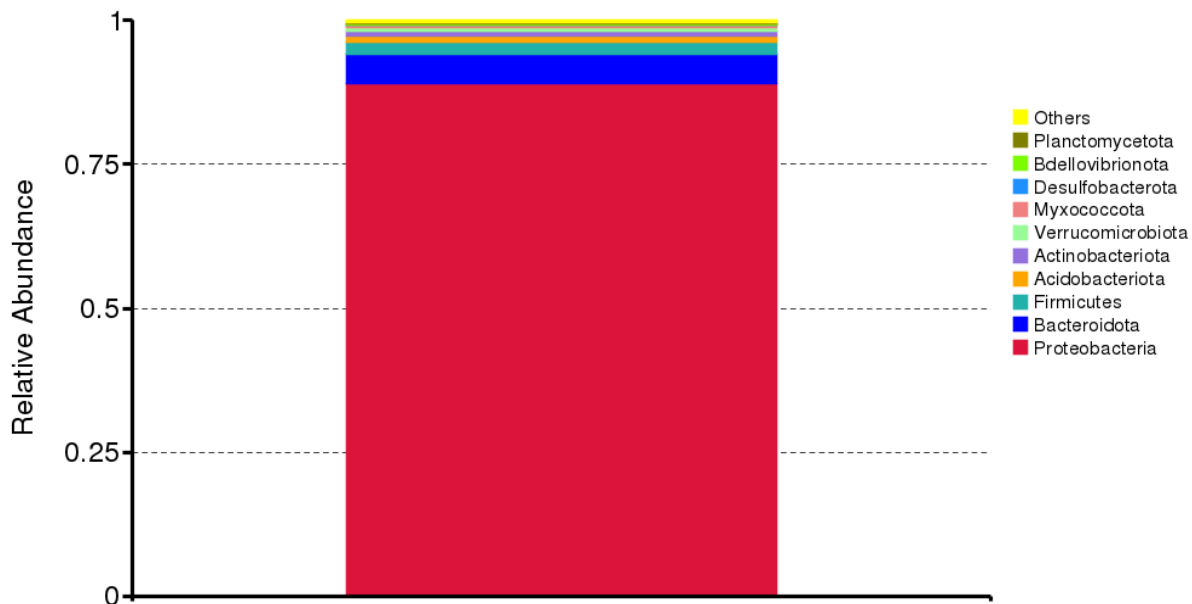


Фиг. Обобщение на етикетите и номера на OTU на всяка проба.

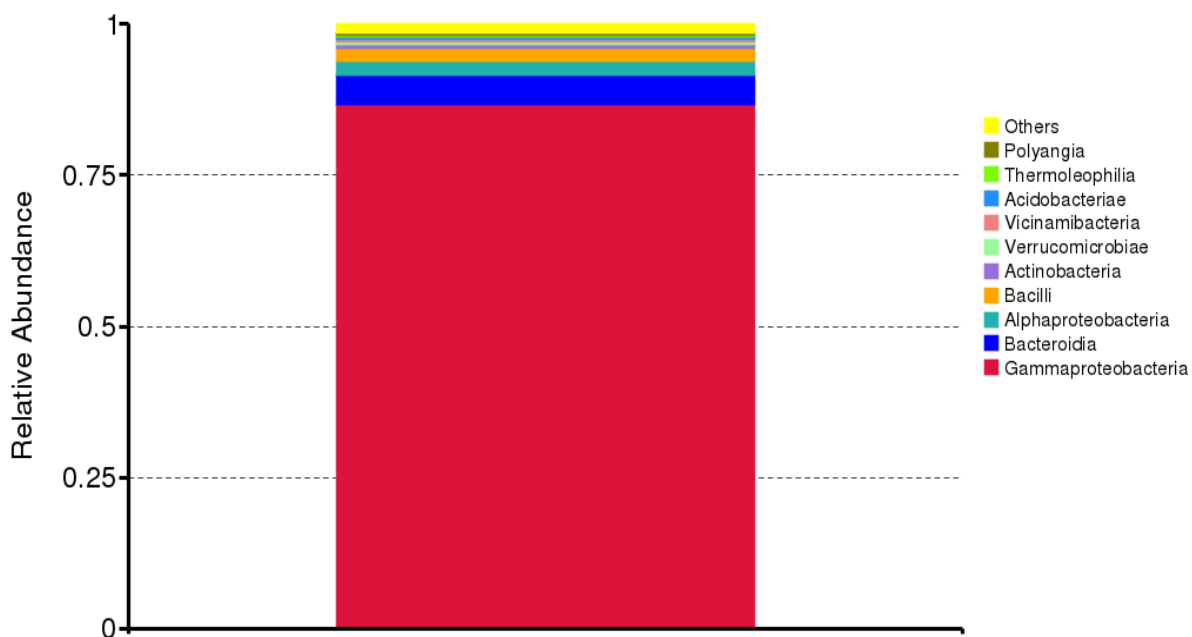
Бележки (отляво надясно): Оста Y1, озаглавена Общо тагове "(червени ленти) означава броя на ефективните тагове; Етикети на таксон" (сини ленти) означава броя на аотираните тагове; Некласифицирани тагове" (зелени ленти) означава броя на неанотираните тагове; Уникални тагове" (оранжеви ленти) означава броя на таговете с честота 1 и се среща само в една проба. Оста Y2,

озаглавена „Числа на OTU“, означава броя на OTU, които се показват като „OTU“ (лилави ленти) на горната снимка, за да се идентифицират номерата на OTU в различни проби.

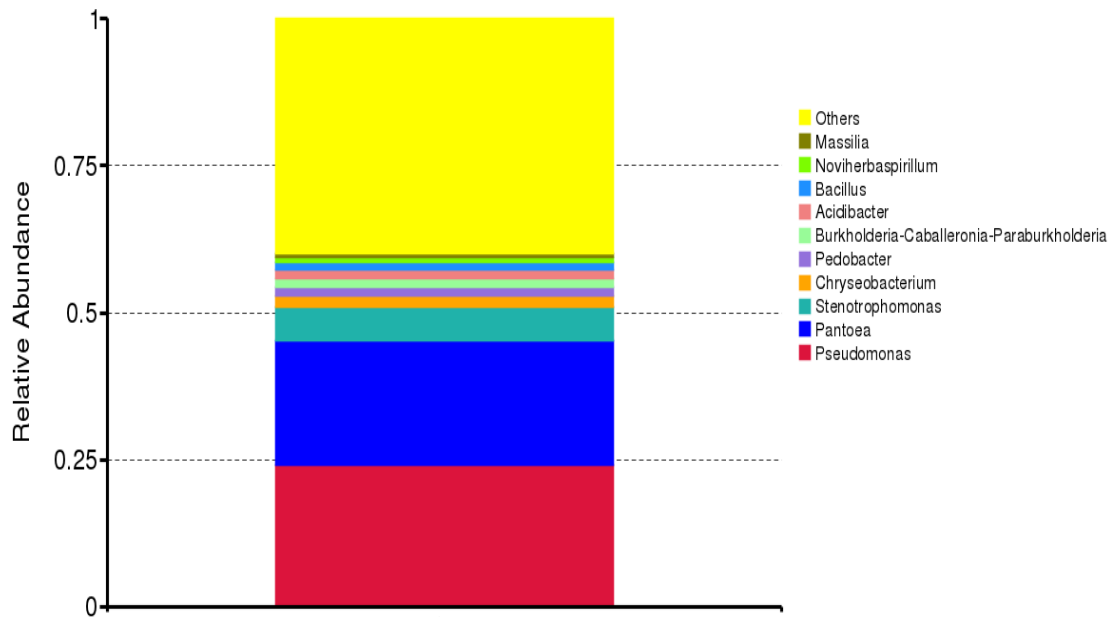
Изобилието от основните бактериални групи във всяка таксономична категория е дадено на Фигура 4 А. Общо бяха открити три бактериални вида и сред тях Proteobacteria (89%) беше най-доминиращата група, следвана от Bacteroidia (5%) и Firmicutes (2,14 %). Установено е, че показанията, принадлежащи към Acidobacteria, са 1%, Actinobacteria 0,9% (Фигура 4 А). По-високото изобилие на протеобактериите (89%) в корените на дивите бобови растения предполага, че членовете на този тип са особено добре способни да колонизират вътрешните растителни тъкани и да се установят като коренови ендозити. Типът Proteobacteria включва няколко класа, които включват растежа на растенията и ефектите като агенти за биологичен контрол на различни заболявания (Bulgarelli et al. 2013).



B)



C)



Фигура

4. Относително изобилие на таксономична анотация на (A) ниво тип, (B) ниво на клас и (C) ниво на род.

Идентифицирани са три основни бактериални класа и сред тях Gammaproteobacteria е най-доминиращата група (87%), Alphaproteobacteria (2%), Bacillus (2%) и Acidobacteria (1%) (Фигура 4 В). Клас Gammaproteobacteria включва 24% Pseudomonas, 21% Pantoea, 16% неклассифицирани видове, 6% Stenotrophomonas и 2% Oxalobacteria (Фигура 4 С). По-голямата част от изолатите в ризосферната почва принадлежат на Proteobacteria, с Pseudomonas spp. представляващи най-доминиращия вид, но ендofитната бактериална общност, от друга страна, се състои почти изключително от Firmicutes (Kumar et al., 2012; Dokic et al., 2010). Установено е, че Firmicutes са метаболитно най-гъвкавата група с производството на множество ензимни дейности (Babalola, 2010). Настоящото разследване откри, че 61% от Firmicutes в ризосферната почва на *S. montbretii* принадлежат на Bacillus, 21% на Peanibacillus и 13% на Sporosarcina. Родът Pseudomonas съдържа много ендofитни бактериални щамове, които са от полза за гостоприемниците, като произвеждат индол-3 оцетна киселина (IAA), произвеждат биоконтролни липопептиди (Bergy, 2010) и солибилизираят фосфат (Otieno et al., 2015). O'Sullivan и O'Gara, 1992 съобщават, че видовете Pseudomonas увеличават усвояването на хранителни вещества, тъй като N, P и K освен това действат като биоконтролиращи агенти на фитопатогенни гъби и произвеждат фитохормони в ризосферата, които насърчават растежа на растенията. Щамовете на Pseudomonas putida са цитирани като разтворители на фосфати (Kumar and Singh, 2001). Видовете Pantoea насърчават растежа на растенията и толерантността към напреженията на околната среда (Chen et al., 2017).

Най-голямо е количеството на бактерии от родове в клас Alphaproteobacteria са Bradyrhizobium (12%), Sphingomonas (5%), Rhizobium (4%), Pedomicrobium (4%) и Phenylobacterium (3%) (фиг. 4 С). Sphingomonas е алфапротеобактериален род, съдържащ щамове, които произвеждат IAA и осигуряват хранителни вещества на гостоприемниците (Ruiza et al., 2011). Bradyrhizobium spp. бяха изобилни във всички анализирани нодули, въпреки разликите в компоста, изменението, предшестващата култура или някоя от разликите в растежната среда, което предполага силна селекция от растението гостоприемник специално за Bradyrhizobium. Този резултат е напълно в съответствие с предишни констатации, че Bradyrhizobium е доминиращият ендofит на соята при киселинни условия. Liu (2021) предлага няколко микроба, Bradyrhizobium, Sphingomonas, Mesorhizobium, Nocardioidea, Acidobacterium и Phenylobacterium, като кандидати за отразяване на плодородието на почвата и здравето на растенията.

В горската канела ризосферната почва от странджанските актинобактерии е около 0,9% (фиг. 4 А). Те играят специфични роли, например като защитават растенията гостоприемници срещу насекоми и болести, особено чрез производството на биоактивни съединения, включително антибиотици, антимикубни, противоракови, противотуморни, ензими, ензимни инхибитори и имunosупресивни агенти (Lee et al., 2014). Установено е, че актинобактериите са обикновени обитатели на почвата и имат висок дял от общата микробна биомаса в горската почва в Китай (Qin et al., 2009).

#### 4. Анализ на разнообразието на бактериалната общност в ризосферната почва от на Мишкова нива

Алфа разнообразието е описано въз основа на индексите Chao1, ACE, Shannon и Simpson. Богатството на видовете се измерва с помощта на индексите Chao1 и ACE, а видовото разнообразие се измерва чрез индексите на Шанън и Симпсън (Таблица 2).

Показателите за алфа разнообразие обобщават структурата на една екологична общност по отношение на нейното богатство (брой таксономични групи), равномерност (разпределение на изобилието на групите) или и двете. Стойността на алфа-разнообразието, получена чрез анализ на MG-RAST и QIIME2, показва, че ризосферната почва на *C. montbretii* има високо микробно разнообразие (Таблица 2).

Таблица 2. Индекси на алфа разнообразие. Статистически индекси на алфа разнообразие (брой прочитания, избрани за нормализиране 53427).

Sample name	observed_s pecies	shannon	simpson	chao1	ACE	goods_ coverage	PD_ whole_ tree
Rhizosphere soil from Strandza	686	4.614	0.884	686	686	1.000	56.246

Кумулативната степен на обяснение на почвата, климата и географските фактори за разнообразието на ризосферните бактерии е 70,20%. Освен това почвените фактори (N, P, K и N/P) и средните годишни валежи бяха основните фактори, които значително повлияха на индексите на алфа-разнообразието.

В заключение, относителното изобилие на Proteobacteria, Bacteroidia и Firmicutes в ризосферната почва на *C. montbretii* е високо. Установено е, че протеобактериите са най-преобладаващият тип и може да са свързани с храносмилането на лигнина, както и с катаболизирането на различни компоненти. Обикновено е известно, че тези бактерии произвеждат различни биоактивни съединения като антибиотици, които са от фармацевтично и индустриално значение (Lee et al., 2014; Babalola, 2010). 2% от анализираните бактерии в почвата са неклассифицирани. Ето защо е важно понататъшното изследване на тези различни бактерии, открити в ризосферната почва на диви бобови растения в Странджа.

#### 5. ДНК базирани маркери за изследване на популационната структура на зародишна палзма от български културни и диворастящи видове - *Cicer montbretii*.

За преценка на ефективността и избор на най-подходящи праймери за генотипиране на представители от сем. *Fabaceae* са тествани общо 21 iPBS и 6 ISSR маркера с представители на цицер, лупина и фасул. Тестваните праймери са описани, като най-ефективни за изследване на генетичното разнообразие при цицер (Andeden et al., 2013). Част от iPBS праймерите са описвани в различни изследвания като информативни и за фасул.

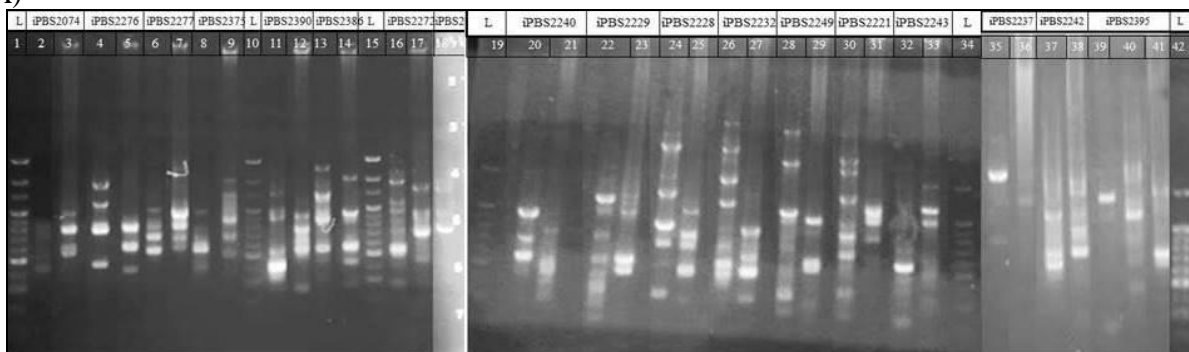
Докато ISSR маркерите отдавна се използват и са доказали своята ефективност при оценка на генетичното разнообразие на представители от сем *Fabaceae*, то iPBS маркерите разработени от Kalendar et al., 2010 г. са използвани малко по-късно през 2015 г. от турски екип. Те са тествали общо 83 iPBS праймера при фасул и са подбрали, като най-информативни 47 от тях (Nemli et al., 2015). След това са проведени още изследвания за оценка на генетичното разнообразие на представители на *Phaseolus vulgaris* с iPBS молекулно маркерната техника (Ozturk et al., 2020, Haliloglu., et al., 2022), получените информативни резултати потвърждават големия потенциал на ретротранспозин базираната техника iPBS за оценка и изследване на представителите от сем. *Fabaceae*.

В настоящето изследване от проведените реакции се вижда, че и двете молекулно маркерни техники (iPBS и ISSR) водят до генериране на ясни профили с различен брой, интензивност и дължина фрагментите. При горепосочените условия на реакциите броя на амплифицираните фрагменти при iPBS реакциите е от 1 до 10, а при ISSR реакциите от 3 до 8.

С избран представител на цицер са проведени всички 21 iPBS реакции и при над 90% от проведените реакции с избраните условия са установени подходящи за генотипиране профили, но при 5 от реакциите с праймери iPBS 2375, iPBS 2390, iPBS 2386, iPBS 2232 и iPBS 2242 се амплифицират повече от 5 фрагмента. При проведените 6 ISSR реакции с представител на цицер при посочените PCR условия се генерират от 3 до 7 фрагмента. За разлика от резултатите получени от Andeden et al., 2013, където са описани средно около 13 фрагмента с iPBS молекулно маркерната техника, при получените от нас резултати броят им е по-малък.



A)



**Фиг.1 Избрани профили на представители от сем. *Fabaceae* генерирани с ISSR и iPBS молекулно маркерни техники.**

\*А) ISSR реакции - фасул - стартове 1, 4 и 8; цицер – стартове 2,3,5,6 и 9; лупина – старт 7 и старт 10 – Ladder

\*В) iPBS реакции - лупина – стартове 2, 4, 6, 8, 11, 13, 16 и 39; цицер – стартове 3, 5, 7, 9, 12, 14, 17, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 38, и 41; фасул – стартове 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 35, 37 и 40; стартове 10, 15, 19, 34 и 42 - Ladder.

При фасула от проведените 13 iPBS и 6 ISSR реакции се амплифицират от 2 фрагмента с праймер iPBS 2237 до 10 фрагмента с праймери iPBS 2229 и iPBS 2249. При ISSR маркерите най-голям брой фрагменти са амплифицирани с UBC 826. При 3 от iPBS реакциите с праймери 2238, 2241 и 2400, и при три от ISSR реакциите с праймери 810, 890 и 807 не са установени амплифицирани фрагменти с тези условия на реакцията.

ЦИЦЕР		ФАСУЛ		ЛУПИНА	
Праймери	Бр. ампл. фрагменти	Праймери	Бр.ампл. фрагменти	Праймери	Бр. ампл. фрагменти
iPBS2074	4	iPBS2240	4	iPBS2074	4
iPBS 2276	3	iPBS 2229	10	iPBS 2276	5
iPBS 2277	4	iPBS 2228	8	iPBS 2277	6
iPBS 2375	7	iPBS 2232	9	iPBS 2375	3
iPBS 2390	6	iPBS 2249	10	iPBS 2390	5
iPBS 2386	6	iPBS 2221	9	iPBS 2386	7
iPBS 2272	5	iPBS 2243	6	iPBS 2272	8
iPBS2394	3	iPBS 2237	2	iPBS2394	3
iPBS2240	4	iPBS 2242	3	UBC 807	8
iPBS 2229	5	iPBS 2395	6		
iPBS 2228	5	UBC 808	7		
iPBS 2232	6	UBC 823	5		
iPBS 2249	3				
iPBS 2221	3				
iPBS 2243	4				
iPBS 2241	2				
iPBS 2237	1				
iPBS 2242	6				
iPBS 2395	3				
UBC 808	7				
UBC 810	6				
UBC 823	3				

UBC 890	6
UBC 826	7

**Таблица 1 Брой генерирани фрагменти съставлящи профила на изследваните образци с проведените iPBS и ISSR реакции**

При лупината са установени най-добри резултати с късите iPBS праймери с ниска Tm. Броя на амплифицираните фрагменти е от 3 до 8, като най-много фрагменти са амплифицирани с праймери iPBS 2276, iPBS 2277, iPBS 2390, iPBS 2386 и iPBS 2272 при iPBS маркерната техника. С използваните ISSR молекулните маркери при посочените условия най-добри резултати са отчетени с маркер UBC 807.

До тук в проекта с избрани iPBS и ISSR реакции са анализирани общо 11 представител на сем. *Fabaceae* (лупина - 4 представител, фасул - 4 представител, виция - 1 представител и цицер – 2 представител).

## Фиг. 2

Тъй като праймерите са основно за цицер и е видно, че за останалите изследвани представители от сем. *Fabaceae* условията на реакциите ще трябва експериментално да се доуточнят допълнително, а направените до тук предположения съответно да се потвърдят или отхвърлят. Независимо от необходимостта за допълнително подобряване на реакциите и условията на електрофореза може да се изкажат някои предположения вижда се, че при лупината вероятно най-информативна ще бъде реакцията iPBS 2228, тъй като при останалите реакции макар, че фрагментите са много слабо интензивни се виждат мономорфни фрагменти между стартове 2 и 3.

За представителя на *Vicia sativa* с тези условия на реакциите генерирани фрагменти има само при ISSR реакцията с UBC808 и профилът на *Vicia sativa* е идентичен с профила амплифициран на лупина от Бродилово (Да уточним имат ли нещо общо между *Vicia sativa* и лупина от Бродилово). По принцип при тази реакция UBC808 са генерирани идентични профили и при двата изследвани представителя на *Cicer monbretti*. За разлика от другата проведена ISSR реакция [ ] профилите на двата *Cicer monbretti* са различни.

## ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Даскалова, Е. и Минков, И., 2007. Молекулярна еволюция. Унив. издателство „П. Хилендарски“ Пловдив, 359 стр.
2. Спасова-Апостолова В., 2017, Молекулярно характеризирани на колекция от мутанти и близкородствени форми пипер. Дисертация 162 стр.
3. Andeden E. E. , F. S. Baloch, M. Derya, B. Kilian, H. Özkan. iPBS-retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual Cicer species. J. Plant Biochem. Biotechnol., 22 (4) (2013), pp. 453-466.
4. Angelova, S., Sabeva, M., Uzunjalieva, K., Guteva, Y. (2018) C W R of Grain Legumes in Bulgaria, 9th International Agricultural Symposium „AGROSYM 2018”, 861-865, ISBN 978- 99976- 718-8-2; COBISS.RS- ID 7815448; <http://agrosym.ues.rs.ba/index.php/en>
5. Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panha, S., 2010. Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Marker. Chiang Mai J. Sci. 37(2): 293-303., [www.science.cmu.ac.th/journal-science/josci.html](http://www.science.cmu.ac.th/journal-science/josci.html).
6. Haliloğlu, Kamil, Aras Türkoğlu, Halil Ibrahim Öztürk, Güller Özkan, Erdal Elkoca, and Peter Poczai. 2022. "iPBS-Retrotransposon Markers in the Analysis of Genetic Diversity among Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm from Türkiye" Genes 13, no. 7: 1147. <https://doi.org/10.3390/genes13071147>.
7. Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P., Schulman, A.H., 2010. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theor Appl Genet 121: 1419–1430, DOI 10.1007/s00122-010-1398-2.
8. Maxted, N. and Guarino, L. and Shehadeh, A. (2003) In situ techniques for efficient genetic conservation and use: a case study for Lathyrus. Acta Horticulturae 623:41-60
9. Nemli, S., Kianoosh, T. and Tanyolac, M., 2015. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 39: 940-948.
10. Öztürk, H. I., Dursun, A., Hosseinpour, A. and Haliloglu, K., 2020. Genetic diversity of pinto and fresh bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm collected from Erzincan province of Turkey by inter-primer

- binding site (iPBS) retrotransposon markers," Turkish Journal of Agriculture and Forestry: 44 (4) 10: 417-427, DOI: <https://doi.org/10.3906/tar-2002-9>.
11. Schulman, A., 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Genetics 8: 973-982.
  12. Uzunova St., Uzunov, S. (2008) Plants in the Strandzha Nature Park, State Forestry Agency and Directorate of Strandzha Nature Park, ISBN 978-954-92093-6-5 (Bg)

Участие в *Международна научна конференция „140 години Земеделска наука в Садово и 45 години ИРГР*

#### Публикации

1. Ангелова С., М. Събева, К. Узунджалиева, М. Петкова, Н. Таксин, 2022, *Cicer montbretii* Jaub. & Spach (цариградски нахут) в Природен Парк Странджа, *Международна научна конференция „140 години Земеделска наука в Садово и 45 години ИРГР*, Септември 28-29, НТС Пловдив (**под печат**)- **сертификат**
2. Mariana Petkova, Maria Sabeva, Slaveya Petrova, Nurettin Tahsin, and Syika Angelova: The bacterial community structure of rhizosphere soil associated with *Cicer montbretii* Jaub. & Spach endemic to Strandzha Mountain. *Ecologia Balkanica* submitted.