



АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ - ПЛОВДИВ

Факултет по агрономство

Катедра "Физиология на растенията, биохимия и генетика"

Божин Максимов Божинов

Използване на молекулярни маркери в изследвания на
генетичното разнообразие и за ДНК профилиране

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд
за присъждане на научна степен
„доктор на науките“*

Област на висше образование **4.0. Природни науки, математика и информатика;**

Професионално направление: **4.3. Биологически науки;**

Научна специалност: **„Генетика“**

П Л О В Д И В

2 0 2 5 г.

Дисертационният труд съдържа 254 страници във формат А4, включително 17 снимки, 33 таблици и 63 фигури. В библиографската справка са включени 280 заглавия, от които 279 на латиница и 1 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита пред Научно жури на заседание на катедра „Физиология на растенията, биохимия и генетика“ при „Факултет по агрономство“ на Аграрния университет - Пловдив, проведено на г. (протокол № от 2025 г.).

Официалната защита ще се проведе на2025 г. от ч. в на „Факултет по агрономство“.

Научно жури:

1. Акад. Атанас Атанасов – рецензент
2. Проф. дн Дияна Светлева – рецензент
3. Доц. дн Самир Наимов – рецензент
4. Чл.-кор. Иван Атанасов – участие със становище
5. Проф. дн Анелия Янчева – участие със становище
6. Проф. д-р Андон Василев – участие със становище
7. Доц. д-р Любка Колева-Вълкова – участие със становище

Благодарности

Авторът на този труд иска да изрази своята благодарност за подкрепата, предоставена от Международната агенция за атомна енергия (Договор № 12814/2004) и Фонд „Научни изследвания“ (Договори ВУ-АН-205/2008 и ДФНИ Б01/16/2012). Възгледите, представени в този документ, са отговорност единствено на автора и не отразяват непременно възгледите на МААЕ и ФНИ по обсъжданите въпроси.

Освен това авторът иска да изрази своята благодарност на Jean-Marc Lacape, Marc Giband, Максим Божинов, Живко Данаилов, Даниела Ганева, Атанас Павлов и Мариана Накова за техния ценен принос с идеи и дискусии. Авторът също така иска да изрази своята признателност към приноса на Елена Тодоровска, Биляна Иванова, Катя Димитрова, Силвия Василева, Милена Костова, Атанас Вучков, Тодорка Сребчева, както и на Михаил Ангелов, Цветан Веновски, Диляна Иванова, Сашо Георгиев, Иван Иванов, Запряна Ганчева, Невена Петрова, Стефани Димитрова и Мария Ташутева.

Авторът също така иска да изрази своята благодарност за навременната HVI услуга, предоставена от Cotton Research Station в Nazilli, Турция.

Съдържание

Увод	1
Цел и задачи.....	2
Материали и методи.....	3
Растителен материал	3
Памук	3
Тютюн	4
Домати.....	4
Пауловния	5
Ечемик	5
Пипер.....	5
Пшеница	6
Царевица	6
Еукариотни растителни патогени	6
Фитофторови гъби.....	6
Fusarium.....	6
Животински организми	6
Кози.....	6
Изолиране на ДНК.....	7
Анализ на маркери	9
RFLP анализ	9
AFLP анализ	10
SSR анализ	11
CAPS анализ	13
ISSR анализи	14
Анализ на скачването	18
Статистически анализ и използван софтуер	19
Резултати	21
Фенотипно вариране	21
Памук	21
Домати.....	29
Кози.....	29
Екстракция на ДНК	31
Памук	31
Домати.....	32
Тютюн	32
Ечемик	32
Пипер.....	32
Пауловния	32
Царевица	32

Пшеница	33
Кози.....	33
Нива на полиморфизъм на молекулните маркери и профили на образците	34
Ко-доминантни маркери	34
Доминантни маркери	37
Използване на доминантните маркери за картиране на QTL	53
Дискусия	56
SSR маркери	56
CAPS маркери	56
ISSR маркери	57
Памук	57
Домати.....	57
Ечемик	60
Тютюн	60
Пшеница	61
Царевица	61
Пипер	62
<i>Phytophthora</i>	62
<i>Fusarium</i>	63
Кози.....	63
Приложимост на ISSR маркерите при РХС тестирането	64
Изводи	69
Приноси	71
Теоретични приноси	71
Приложни приноси	72
Abstract	73
Използвана литература.....	74

Увод

От 90-те години на миналия век са налични редица видове ДНК-базирани молекулярни маркери, чийто потенциал за практическо приложение е многократно дискутиран както от разработчиците, така и от цяла плеяда изследователи, охарактеризирали приложимостта им при различни организми – диви и културни растения и животни, както и разнообразни микроорганизми. Идентифицирана и добре документирана е способността им да улеснят както конвенционалната селекция, така и усилията, насочени към ускорено разработване на нови форми организми, които да отговарят по-добре на бързо променящите се условия на околната среда и изисквания на пазара. В резултат на това редица маркерни системи от години се използват за ускоряване на селекционния процес, гарантиране генетичната идентичност на размножителните материали и защита на интелектуалната им собственост в големите селекционни компании. Поради високата първоначална цена на приложение използването на тези маркерни системи от селекционни колективи, разчитащи на публично финансиране в нашата страна, до неотдавна беше ограничено. С развитието на технологиите за ДНК секвениране и амплификация себестойността на използването им намалява в геометрична прогресия и понастоящем този инструментариум е лесно достъпен както от финансова, така и от технологична гледна точка. Въпреки това в българските държавни институти и университети, ангажирани със селекционни задачи, използването им продължава да бъде твърде ограничено. Същото важи и за институциите, отговорни за регистрацията и контрола на посевния и посадъчен материал (ИАСАС) и размножителен материал при животните (ИАСРЖ). В основата на проблема стои липсата на стандартизация на използваните системи и протоколи между двете групи институции, дължаща се и на различаващите се изисквания към функционирането на всяка от тях.

Многогодишният опит на автора с използването на редица маркерни системи при широк диапазон от организми му позволява да формулира хипотеза за решаването на така идентифицирания проблем, чиято защита е обект на настоящия дисертационен труд. Той обобщава различни приложения на няколко доминантни (т.е. AFLP, ISSR, CAPS) и ко-доминантни (RFLP, SSR) маркерни системи. Това включва използването на двата типа маркери при анализиране на генетичното разнообразие на различни източници на зародишна плазма, заедно със създаване и предлагане на подходи за ДНК генотипиране на редица култури, микроорганизми и две породи животни. Аргументите за избор на единия или

другия инструмент са представени в контекста на съответните проучвания, така както са извършени от автора.

Настоящият труд обобщава разнообразните усилия на автора да направи молекулярните инструменти разбираеми и използвани за българската селекционна общност в нейните основни профили – растениевъден и животновъден.

В заключение е аргументирано използването на ISSR маркерите като инструментариум, еднакво удобен за изследване и съхраняване на генетичното разнообразие, в селекционно-развъдната дейност и в държавното сортоизпитване (при РХС тестирането на кандидат-сортове и породи).

Цел и задачи

Целта на настоящия труд е да бъде установена молекулярна маркерна система и същата да бъде предложена за надеждно и възпроизводимо идентифициране на генетичното разнообразие, както в растителни, така и в микроорганизмени и животински форми. Същевременно, идентифицираната маркерна система следва да може да бъде лесно мащабируема, така че да позволява използване както за селекционни цели, така и за целите на контрола при сортоизпитването и семепроизводството/развъждането на местни породи.

За постигане на поставената цел са формулирани за изпълнение следните задачи:

1. Да се проведе сравнително изпитване на набор от маркерни системи за идентифициране на генетичното разнообразие при растителните видове (памук, домати, тютюн, ечемик и др.), еукариотните фитопатогени (фитофторови и фузариини гъби) и животни (кози).
2. Да се установят възможностите за прилагане на изследваните маркерни системи с цел откриване на локуси за количествени признаци със специфична важност за местните популации.
3. Да се характеризират възможностите за прилагане на подбраните маркери в сортоизпитването, сортоподдържането и съхранението на съществуващото биоразнообразие на местни растителни форми и породи животни.

Допълнително са формулирани и 4 подзадачи:

- Да се установят възможностите за прехвърляне на маркери между различни генетични карти (публикувани по-рано и разработени в рамките на настоящото изследване) при някои местни растителни и животински форми;

- Да се определят молекулни маркери, свързани с качествените характеристики при характеризирание на разпадащи се вътревидови популации;
- Да се определят локуси за количествени признаци в различни генотипове с практическа приложимост за българската селекция;
- Да се уточни способността на предлаганата маркерна система за идентифициране на генетично разнообразие на различни нива – вътресортово/вътрепородно, междусортово/междущамово/вътревидово, междувидово.

Материали и методи

Растителен материал

Памук

Картиращата популация за картирането на AFLP и SSR маркерите е съставена от 75 растения BC1 и произхожда от кръстоската „Guazuncho 2” × „VH8-4602”. „Guazuncho 2” е модерен чистотинен сорт *G. hirsutum*, създаден в INTA, Аржентина. Той беше избран заради цялостното си добро производствено представяне, оценено в различни тропически страни (В. Нац, лична комуникация). „VH8-4602” произхожда от Антигуа и произлиза от кръстоска на две форми *G. barbadense* – MSI и V135. MSI се отнася до сортове *G. barbadense*, култивирани в Барбадос през 80-те и 90-те години на миналия век, а V135 е селекция от остров Сейнт Винсент с подревен произход (Pauly, 1991). Първоначалното кръстосване използва пет различни женски Guazuncho 2 × мъжки VH8 растения; след това F₁ бяха възвратно кръстосани с четири различни растения Guazuncho 2, използвани като майчини.

Българският сорт Чирпан 603 е селектиран за изследване на ефектите от мутагенните третиране върху качествените характеристики на влакната, тъй като е стандартен сорт, покриващ повече от 80% от площта на отглеждане от 2005 до 2016 г. Подходът включваше индуциране на мутации чрез гама облъчване на стандартния генотип, последвано от самоопрашване на потомствата за няколко поколения преди анализа на локусите за количествени признаци (QTL). Индуцирането на мутациите имаше за цел подобряване на качеството на влакното и технологичните показатели. Мутантната сегрегираща популация, която произлезе от това третиране, беше използвана за целите на построяване на генетична карта на локуси за количествени признаци със съществен ефект при местните условия.

Тютюн

В изследването са включени четири търговски сорта от двата най-разпространени вида тютюн в България (Ориенталски и Бърлей). За оценка на съществуващото вътрешносортно разнообразие са използвани по осем растения от всеки - три ориенталски сорта (Пловдив 7, Неврокоп 1146 и Крумовград 90) и един тип Бърлей (Бърлей 1317), които са широко разпространени у нас.

Домати

Двадесет и четири генотипа домати, предоставени от Института по физиология на растенията и генетика (ИФРГ, бивш Институт по генетика „Проф. Д. Костов“) и представляващи три основни групи, са използвани за изследване на приложимостта на доминантната маркерна система ISSR:

1. Диви видове (8 генотипа) - *Lycopersicum hirsutum* IVT 66087, *Lycopersicum glandulosum* IVT 48090, *Lycopersicum minutum* 911, *Lycopersicum pimpinellifolium* LA 0722, *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme* LA 1226, *Lycopersicum parviflorum* LA 2072, *Lycopersicum f. glabratum* LA 2864 и *Lycopersicum peruvianum* LA 2172;
2. Детерминантни (sp) сортове и селекционни линии (10 генотипа) - 533/06 (Трапезица), 540/06 (Бела), 541/06, 560/06, 561/06, 564/06, 573/06, 618 /06, 632/06 и 636/06
3. Индетерминантни (sp+) селекционни линии (6 генотипа) - 707/06, 708/06, 710/06, 792/06, 798/06 и 803/06.

Всички детерминантни и индетерминантни сортове и селекционни линии принадлежат към вида *Lycopersicum esculentum* Mill. (*Solanum lycopersicum*).

Дивите видове се поддържат от ИФРГ / ИЗК „Марица“ и се използват в селекционните програми като донори на икономически важни характеристики като устойчивост на биотичен и абиотичен стрес. Освен това някои от тези видове се оказали ценни източници на качества, свързани с подобряване на качеството на плодовете – съдържание на сухо вещество и антиоксидантни компоненти (аскорбинова киселина, ликопен, бета-каротин и др.).

За изследване на приложимостта на доминантните и ко-доминантни маркери беше използван растителен материал от 8 български образци: сорт Пловдивска каротина (с генетичен фон от *Solanum chillense*), сорт ИЗК Аля (тип чери – с генетичен фон от *Solanum pimpinellifolium*) и 6 селекционни линии домати (L21β, L53β, L1140, L1116, L975, L984) от

Института по зеленчукови култури (ИЗК „Марица“), Пловдив, България. Всеки генотип беше представен от 7 отделни растения.

За целите на изследването със SCAR маркери бяха използвани 20 линии домати от селекционната програма на ИЗК „Марица“, които бяха тествани за устойчивост на ToMV патотипове 0, 1 и 2. Като контроли бяха използвани линии, за които е известно, че са носители на съответните гени за устойчивост, а като отрицателна контрола беше използван сорт „Идеал“, за който е известно, че не притежава гени за устойчивост.

Растенията бяха отгледани в терини, върху торфено-перлитна смес (2,5:1) във фитостатна камера при температура 22-25°C и фотопериод 14/10 h.

Пауловния

Тествани са няколко генотипа, налични в Аграрния университет – Пловдив към момента на експеримента. Те бяха избрани като:

- *P. tomentosa* е описана като мразоустойчива (до -27°C) ;
- *P. fortunei* – като студоустойчива (до -0°C), но изключително бързорастяща и с висока екологична пластичност; и
- *P. elongata* – мразоустойчива (до -16°C).

Анализирани са следните линии/хибриди: *P. elongata*, *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata* x *P. elongata*.

Ечемик

Двадесет и четири селекционни линии и сортове на *Hordeum vulgare* ssp. *distichum* L. са включени в изследването според предварителната информация за тяхната генетична отдалеченост. Генотипове 82105326, 89105100, 96105023, 96105024, 96105027, 96105046, 96105050, 99105020, 99105030 и I-Da/102 бяха предоставени от Националната генна банка (IPGR) – Садово. Перспективни селекционни линии 508, 511 и 622 са резултат от селекционната работа на Катедрата по генетика и селекция на Аграрен университет – Пловдив. Сортовете Алексис, Бета Кецорас, Емон, Каменица, Каравела, Каскадьор, Обзор и новосъздадените сортове Неда и Гораст също бяха включени като референтен материал. Орфей и Кифи са предоставени от Института по земеделие, Карнобат.

Пипер

За целите на изследването бяха използвани местни популации и сортове, принадлежащи към видовете *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens* и *Capsicum chinense*.

Образците се поддържат в частни стопанства и се използват в селекционни програми, като донори на гени за антиоксидантни съставки

(капсаицин, капсантин) и други характеристики на плода, за семепроизводство и като декоративни растения. Някои от тези линии служат и като ценни източници на признаци от агрономическо значение.

Пшеница

Обект на изследване бяха 11 генотипа пшеница, заложи в колекционен питомник в Селекционната градина на катедра ФРБГ при Аграрен университет-Пловдив. Част от образците са събрани от цяла България, а други са селектирани в бившата катедра Генетика и селекция. Използваните генотипове са Авеню, Софру, Терес, Енола, Солехио, Хеликс, Предел, Сая, Реядур и Пибрак

Царевица

Обект на изследване бяха 15 генотипа царевица, представляващи основните отглеждани в страната хибриди. Растения от всеки хибрид бяха отгледани в оранжерията на катедра ФРБГ при Аграрен университет-Пловдив за получаване на необходимата листна маса.

Използваните генотипове са DKC 4709, LG 31.325 Limagold RS, KWS Giro, KWS Hypolito, SOUFFLET ISULEA, SOUFFLET PIANELLO, DKC 4611, DKC 5092, DKC 5075, P 9241, P 9889, P 9415, P9610, P 8834, P 9363.

Еукариотни растителни патогени

Фитофторови гъби

Изследването беше извършено с 22 изолата на *Phytophthora* sp., взети от областта на кореновата шийка на заразени черешови, ябълкови и крушови дръвчета, както и два изолата от ягоди и секвоя.

Fusarium

Изследването беше извършено с 8 изолата на *Fusarium* sp., събрани от района на Пловдив. Видовото определяне на изолатите беше извършено в кат. Фитопатология на АУ-Пловдив.

Животински организми

Кози

Установени са две местни породи кози с отличителен екстериор, устойчиво предаван в потомството – Калоферска дългокосместа коза и Българска витороба дългокосместа коза (Sedefchev et al., 2011; Vuchkov and Dimov, 2011; Vuchkov et al., 2011) избрани за проучване. Проучена е и субпопулацията на Калоферската коза в обособения район на Югозападна България. В Благоевградска област имаше 5 стада български витороби дългокосмести кози, разположени в следните села – Кресна;

Кърналово с. Дреново; Петрич; община Хърсово, Сандански; с. Плошки, Сандански.

Изследвани са общо 45 женски и 15 мъжки образци (зрели) от Българската виторуга дългокосместа коза.

По същия начин бяха избрани 45 женски и 15 мъжки от 5 стада от Каловферски дългокосмести кози в района на Банско, Симитли, Влахи, Кресна и Долна Градешница.

Изолиране на ДНК

Памук

ДНК на памук е извлечена от млади напълно развити листа. За AFLP анализа три грама на проба, включително BC1 популация, родители, F₁ и диплоидни видове, бяха замразени и смлени. След това ДНК се изолира чрез метода на метилалкилтриметиламониев бромид (МАТАВ), както е описано в (Risterucci et al., 2000) и допълнително пречистени чрез ултрацентрифугиране до седиментационно равновесие в градиент на цезиев хлорид – етидиев бромид.

За ISSR и SSR анализи 150 mg на проба, включително родители, оригинален сорт (в случай на мутационна популация), F₁/M₁, F₂/M₂ и следващите поколения бяха замразени в течен азот и смлени в хаван. След това ДНК се изолира с използването на PhytoPure DNA extraction kit (Amersham-Pharmacia). Протоколът на производителя беше следван с малки модификации.

Домати

ДНК проби от домати бяха екстрахирани от замразена листна тъкан (250-300 mg) на растения, отглеждани на полето, като се използва стандартна СТАВ процедура съгласно (Murray and Thompson, 1980), с модифициран екстракционен буфер, съдържащ 2% СТАВ, 4% PVP, NaCl, Tris-HCl (pH 8.0) и EDTA-Na₂ (pH 8.0). Добавянето на 8M LiCl към екстракционния буфер беше полезна стъпка за отстраняване на огромното количество РНК в началния етап на екстракцията. След няколко (3-4) екстракции с хлороформ-изоамилов алкохол, ДНК се утаява със студен изопропанол. ДНК пелета се промива със 76% EtOH, съдържащ 10 mM амониев ацетат в продължение на 30-45 минути при 4°C, за да се елиминират следите от полизахариди. Изсушената ДНК се разтваря в 1 x TE буфер и останалото съдържание на РНК се отстранява чрез третиране с RNaseA в продължение на 45 минути при 37°C. След екстракция с хлороформ-изоамилов алкохол, ДНК се утаява с 5M NaCl и 2 обема 96% студен етанол до крайна концентрация от 0.2M. ДНК допълнително се промива със студен 70%

етанол, изсушава се и се разтваря в малък обем 1 x TE буфер. Изолираната ДНК е с високо качество ($A_{260}/_{280} = 1.7 \div 2.0$), което позволява безпроблемна амплификация на микросателитни локуси.

Тютюн

ДНК на тютюна е извлечена от последния напълно развит лист на растението, отглеждани в оранжерия. Приблизително 200 mg проби от листа бяха замразявани в течен азот и преди смилане в хаван. ДНК от всяко растение беше екстрахирана с помощта на стандартен комплект за екстракция на ДНК (Nucleon PhytoPure, Amersham Biosciences UK Ltd., Бъкингхамшир, HP7 9NA Англия) с незначителни модификации на протокола на производителя.

Пауловния

ДНК е извлечена от последния напълно развит лист на растението, отглеждани в оранжерия. Приблизително 200 mg проби от листа бяха замразявани в течен азот и преди смилане в хаван. ДНК от всяко растение беше екстрахирана с помощта на стандартен комплект за екстракция на ДНК (Nucleon PhytoPure, Amersham Biosciences UK Ltd., Бъкингхамшир, HP7 9NA Англия) с незначителни модификации на протокола на производителя.

Ечемик

ДНК от екземпляри на ечемик беше изолирана от 40 mg замразена листна тъкан. Пробите бяха смилани в хаванче в течен азот до получаване на фин прах. „EZNA® Plant DNA Mini Kit” (Omega Bio-tek, Inc., Georgia, USA) е използван за пречистване на ДНК, както е препоръчано от производителя, като е приложен протоколът за бърза екстракция.

Пупер

За екстракция на ДНК бяха използвани само растенията, отговарящи напълно на фенотипните описания по UPOV за съответната форма или сорт. Хомогенността на тези генотипове до момента не е била изпитвана с помощта на молекулярни маркери.

ДНК бе изолирана от последния млад, напълно развит лист на избраните и маркирани за нуждите на изследването растения, отглеждани на открито, в контейнери, при еднакви условия.

Триста милиграма листен материал от всеки образец бяха стривани след замразяване в течен азот до получаването на фин светлозелен прах. За изолацията на ДНК бе избран метода с използване на екстракционен кит E.Z.N.A. Plant DNA Kit на Omega Bio-Tek.

Пшеница

ДНК беше изолирана от 60 mg замразена листна тъкан. Пробите бяха смилани в хаванче в течен азот до получаване на фин прах. „EZNA® Plant DNA Mini Kit” (Omega Bio-tek, Inc., Georgia, USA) беше използван за пречистване на ДНК, както е препоръчано от производителя, като беше приложен протоколът за бърза екстракция.

Царевица

ДНК беше изолирана от 60 mg замразена листна тъкан. Пробите бяха смилани в хаванче в течен азот до получаване на фин прах. „EZNA® Plant DNA Mini Kit” (Omega Bio-tek, Inc., Georgia, USA) беше използван за пречистване на ДНК, както е препоръчано от производителя, като беше приложен протоколът за бърза екстракция.

Кози

Изборът на изходен материал за екстракция на геномна ДНК от кози беше направен, за да се приложи неинвазивно събиране на проби и да се избегне всякакъв стрес за животните.

Изолирането на геномна ДНК от космени фоликули на Калоферска дългокосместа порода и Българска витороба дългокосместа порода е извършено с innuPREP DNA Kit (IST Innuscreen GmbH, Germany). Беше спазен протоколът на производителя и стъпките бяха оптимизирани за условията в нашата лаборатория.

Визуализацията на изолираната геномна ДНК от всички проби се извършва след електрофоретично разделяне на продуктите в 1% агарозен гел. Пет µl от крайния разтвор от екстрахираната ДНК се прилагат към всеки слот и оцветяването се извършва с етидиев бромид.

Анализ на маркери

RFLP анализ

Беше тестван набор от 210 RFLP сонди, разработени от A. Paterson (Plant Genome Mapping Laboratory, University of Georgia, Athens, Georgia). Тези сонди са получени от различни *Gossypium* spp. геномни и cDNA библиотеки, описани в (Reinisch et al., 1994). Пробите бяха получени чрез PCR амплификация, използвайки консенсусни M13 обратни и прави праймери. Освен това бяха картирани и 4 сонди, съответстващи на кандидат-гени за удължаване на влакна, за които е установено, че са полиморфни. Те са получени чрез PCR амплификация на геномна ДНК на памук (*G. hirsutum* 'Coker 310'), използвайки праймери, базирани на публикуваните последователности. И накрая, от 80-те сонди *Arabidopsis thaliana* ESTs (префикс At), разработени в рамките на проект European

EuDicotMap, 14 показваха ясна хибридизация с памук, а 11 бяха картирани. Връзките на картираните номера на сондата „At” към номенклатурата на референтната сонда са дадени в Таблица 1.

Таблица 1. Съответствие на имената на локусите с референции на клоновете и EMBL последователностите на 11 "At" локуса, получени от частично секвенирани cDNAs на *Arabidopsis thaliana*.

Локус	Референтен клон	Референтна последователност в EMBL	Хромозома
<i>At03</i>	34B8T7	T04245	c14
<i>At09</i>	82G7T7	T20487	c14
<i>At16</i>	109G22T7	T41886	c23
<i>At17</i>	113C1T7	T42378	c18
<i>At18</i>	114I16T7	T43072	c3
<i>At24</i>	129H11T7	T45078	c20
<i>At30</i>	146A20T7	T75767	c26
<i>At47</i>	193B3T7	H75998	D08
<i>At51</i>	221F10T7	N38650	c18
<i>At55</i>	247P2T7	AA597935	c16
<i>At60</i>	E3H3T7	AA042198	c9bot

ДНК проби (7 µg) на двамата родители бяха срязвани с пет различни ензима, EcoRI, EcoRV, BamHI, HindIII и XbaI, като се използваха 6U ензим за реакцията. ДНК фрагменти се разделят върху 0,8% w/v трис-ацетат-EDTA (ТАЕ) агарозни гелове за 17 часа при 20 V. Southern blots на родителите се приготвят за скрининг на полиморфизъм и сегрегация на ивиците. След като се изберат най-добрите комбинации сонда-ензим от родителските форми, пробите след това се хибридизират към съответните растения BC₁, които също включват интегрирана ДНК на двамата родители, F₁ и трите диплоидни вида. Блотингът, маркирането на пробите, Southern хибридизацията и авторадиографията бяха проведени, както е описано в (Lanaud et al., 1995), с изключение на това, че етапите на прехибридизация и хибридизация се извършват при 65°C за 4 часа и за една нощ, съответно.

AFLP анализ

AFLP анализът беше извършен с помощта на Life Technology AFLP™ система за анализ I (Gibco BRL, Gathersburg, MD), използвайки двустъпкова амплификация, както е описано от (Vos et al., 1995). Пробите от геномна ДНК бяха срязани с помощта на 2,5 U EcoRI и MseI. Предварителната PCR амплификация се извършва с използване на +1 праймери (EcoRI+A, MseI+C). Следваща реакция на селективна амплификация с използване

на +3-праймери беше проведена с [γ - 33 P]АТР крайно белязани EcoRI праймери. Протоколът беше изпълнен както е препоръчано от доставчика, с незначителни модификации, както е описано подробно в (Risterucci et al., 2000). Използвани са осем EcoRI и осем MseI праймера, което прави общ набор от 64 EcoRI-MseI комбинации (Таблица 2).

Таблица 2. Матрица на комбинациите от използвани селективни нуклеотиди за MseI и EcoRI праймерите.

MseI праймер		M1 CAA	M2 CAC	M3 CAG	M4 CAT	M5 CTA	M6 CTC	M7 CTG	M8 CTT
Селективни нуклеотиди									
EcoRI праймер									
E1	AAC	x	x	x	x	x	x	x	x
E2	AAG	x	x	x	x	x	x	x	x
E3	ACA	x	x	x	x	x	x	x	x
E4	ACT	x	x	x	x	x	x	x	x
E5	ACC	x	x	x	x	x	x	x	x
E6	ACG	x	x	x	x	x	x	x	x
E7	AGC	x	x	x	x	x	x	x	x
E8	AGG	x	x	x	x	x	x	x	x

SSR анализ

Памук

SSR маркерите, използвани за интегрирано изграждане на карта, са разработени в Националната лаборатория Brookhaven (префикс BNL). Всички тези BNL микросателити са получени от *G. hirsutum* „Acala Maxxa” геномни библиотеки, обогатени за GA и CT инсърти според (Ostrander et al., 1992). Клонираните последователности, използвани за конструиране на праймерите, са достъпни на <https://www.cottongen.org/>.

Условията за SSR анализ са описани в (Risterucci et al., 2000) използвайки [γ - 33 P]АТР крайно маркиран "прав" праймер и 55°C температура на топене. SSR праймерите първоначално бяха тествани върху двамата родители за тяхната способност да произвеждат полиморфни продукти. От 216 тествани SSR, 188 са както правилно амплифицирани, така и полиморфни.

Изборът на SSR праймери за използване при откриването на QTL за качество на влакното в българския генетичен произход беше направен след сравняване на няколко от публикуваните генетични карти на памука. По времето, когато беше направен изборът, вече бяха налични няколко карти (Guo et al., 2006; Jia et al., 2016; Mei et al., 2004; Nguyen et al., 2004; Park et al., 2005; Song et al., 2005; Zhang et al., 2002). Нашият избор

беше базиран на наличната информация от картата на (Zhang et al., 2005), които тестват много SSR маркери, разработени в Brookhaven National Laboratory (BNL) върху вътревидово кръстосване, което включва широко използван в този вид изследвания референтен сорт TM-1. От тази карта бяха избрани шест SSR, разположени на или тясно свързани с QTL за качество на влакното. Допълнителни SSR маркери бяха избрани от картата на (Song et al., 2005), които са работили върху популацията BC1 от друга вътревидова кръстоска (TM-1 x Hai 7124). Изборът беше доведен до 15 SSR след извършване на сравнителен анализ на тези две карти с референтна публикация за QTL анализ (Lacape and Nguyen, 2005). Последователностите на SSR праймери бяха изтеглени от базата данни на CMD (<https://www.cottongen.org/>) и олигонуклеотиди, синтезирани от Microsynth Plc. (Швейцария).

Домати

Публикуваните праймери за микросателитни маркери при домати (<http://solgenomics.net>; <http://marker.kazusa.or.jp/Tomato>), определени като локус-специфични праймери (LP), бяха синтезирани с генерични не-комплементарни нуклеотидни последователности tagF 5'ACGACGTTGTAAAA3' и tagR 5'CATTAAAGTTCCCATTA3', съответно в техните 5' краища, както е описано в (Hayden et al., 2008). Аликвотни части от праймерите (50 pM/μl) бяха приготвени чрез смесване на еквимоларни количества от прави и обратни праймери в milliQ H₂O и бяха посочени като набори от основни праймери за всеки локус. Освен това бяха синтезирани и два генерични таг праймера, а именно tagF' и tagR' със същите последователности 5'ACGACGTTGTAAAA3' и 5'CATTAAAGTTCCCATTA3'. Праймерът tagF' (5'ACGACGTTGTAAAA3') беше маркиран в своя 5'край с едно от следните флуоресцентни багрила: FAM, ATTO565, ATTO550 и YELLOW YAKIMA (Applied Biosystems), което позволява директно откриване на алели на автоматизиран капиларен секвенатор (ABI3730, Applied Biosystems). Всички праймери са синтезирани от Microsynth AG (Switzerland).

Всички униплексни PCR реакции (PCR) се извършват съгласно (Hayden et al., 2008) в 6 μl реакционна смес, съдържаща 20-25 ng геномна ДНК, 2xMyTaq HS микс (Bioline), 75 nM от всеки белязан с багрило tagF' и небелязан tagR' праймери и подходяща концентрация (20, 30 или 60 nM) на небелязан локус-специфичен праймер (LPS), в зависимост от използваните маркерни групи.

PCR беше извършван на Veriti96 Thermal Cycler (Applied Biosystems), като се използват следните PCR условия, в зависимост от температурата на

топене на локус-специфичните праймери. Те бяха извършени според (Hayden et al., 2008) и (Tsonev et al., 2013) с някои малки модификации. Електрофореза и визуализация на SSRs на домати бяха извършени на ABI3730 ДНК анализатор (Applied Biosystems). За приготвяне на SSR продукти за електрофореза беше използвана стандартизирана процедура за многократно обединяване.

Обединяването на PCR продукти с различни багрила при 1:1:1:1 имаше за цел да отчете разликите в относителната флуоресценция на всеки флуорофор. В случаите, когато интензитетът на SSR ивиците, специфични за даден SSR, е 2-3 пъти по-висок, се извършва промяна на съотношението, така че интензитетът на ивиците, белязани с различни флуорофори, да бъде сравнително изравнен.

CAPS анализ

Секвенциите, намиращи се в Tm-2 локуса (tm-2, Tm-2 и Tm-22), са публикувани от (Lanfermeijer et al., 2003) в базата данни GenBank към NCBI под номера AF536199, AF536200 и AF536201, отговарящи съответно на алели tm-2, Tm-2 и Tm-22.

Локус Tm-2 при домати беше генотипиран с помощта на един CAPS маркер (Таблица 3), описан от (Shi et al., 2011).

Таблица 3. Секвенции на праймерите, използвани за провеждане на CAPS анализ.

Маркер	Праймер	Секвенция
CAPS	Tm2RS-f3	TGGAGGGGAATATTTGTGGA
	Tm2RS-r3	ACTTCAGACAACCCATTCGG

Очакван размер на получения фрагмент – 703 bp.

Рестрикция на PCR продукта за CAPS маркера

По 5 µl от всеки PCR продукт бяха подложени на рестрикция с три ензима – BspI, KspAI и Alw21I (Fast Digest, Fermentas) съгласно инструкциите на производителя в обем от 15 µl реакционна смес. Използваните ензими са изошизомери на посочените от (Shi et al., 2011), съответно за PshAI, HpaI и BsiHKA I.

Визуализация на получените ДНК фрагменти на агарозен гел

По 10 µl рестрикционен продукт или 5 µl PCR продукт бяха нанесени върху 1% агарозен гел. Електрофорезата бе проведена за 60-75 min при 5 V/cm. Фрагментите бяха оцветени с DNA Stain G (Serva) и визуализирани с трансилюминатор при дължина на вълната 312 nm.

ISSR анализи

Памук

Общо 14 праймера бяха тествани върху изследваните образци памук. След елиминиране на праймерите, които не продуцираха полиморфизми при първоначалното тестване, ISSR анализът беше продължен чрез използване на група от 10 праймера, чиито последователности са представени в Таблица 4. Наличието или отсъствието на всеки ISSR фрагмент беше оценявано в двоична система (1 = присъства, 0 = липсва).

Таблица 4. Последователности на ISSR праймери, използвани за извършване на PCR реакции с ДНК на памук.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 1	(CA) 8AA+GG	20
ISSR 2	(CA) 8AA+GC+T	21
ISSR 3	(GA) 8C+TC	19
ISSR 4	(AG) 8C+TC	19
ISSR 5	(AC) 8C+TA	19
ISSR 6	(AC) 8C+TG	19
ISSR 7	(AG) 8C+TG	19
ISSR 8	(AC) 8C+TT	19
ISSR 9	(AG) 8C	17
ISSR 10	(GA) 8T	17

Тютюн

Общо 4 праймера бяха тествани върху екземпляри на тютюн с техните последователности, представени в Таблица 5. Наличието или отсъствието на всеки ISSR фрагмент се оценява като символ на двоична единица (1 = присъства, 0 = липсва).

Таблица 5. Последователности на ISSR праймери, използвани за извършване на PCR реакции с ДНК на тютюн

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 1	(CA) 8AA+GG	20
ISSR 2	(CA) 8AA+GC+T	21
ISSR 6	(AC) 8C+TG	19
ISSR 7	(AG) 8C+TG	19

Домати

ISSR анализът беше извършен чрез тестване на няколко праймера. Изборът на крайната група от 10 праймера Таблица 6 се основава на скрининга на първоначално избраните праймери спрямо наличните данни за честотата на тандемни повтори в генома на доматиите.

Таблица 6. Последователности на ISSR праймери, използвани за извършване на PCR реакции с ДНК на домати.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 1	(CA) 8AA+GG	20
ISSR 2	(CA) 8AA+GC+T	21
ISSR 3	(GA) 8C+TC	19
ISSR 4	(AG) 8C+TC	19
ISSR 5	(AC) 8C+TA	19
ISSR 6	(AC) 8C+TG	19
ISSR 7	(AG) 8C+TG	19
ISSR 8	(AC) 8C+TT	19
ISSR 9	(AG) 8C	17
ISSR 10	(GA) 8T	17

Ечемик

За да се оцени относителното генетично разстояние между генотипове на ечемик, беше използван набор от 9 ISSR праймера (Vasileva, 2018), като техните характеристики са посочени в Таблица 7.

Таблица 7. Списък на ISSR праймери, използвани в експерименти с ечемик.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR_4	AGA GAG AGA GAG AGA GCT C	19
ISSR_6	ACA CAC ACA CAC ACA CCT G	19
ISSR_7	AGA GAG AGA GAG AGA GCT G	19
ISSR_8	ACA CAC ACA CAC ACA CCT T	19
ISSR_10	GAG AGA GAG AGA GAG AT	17
ISSR_5	RYG ACA GAC AGA CA	14
ISSR_6a	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	18
ISSR_7a	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18
ISSR_11	GAG AGA GAG AGA GAG AA	17

PCR реакциите се провеждат в 25 µl обем със следния цикличен режим: денатуриране при 94°C за 3 min, 40 цикъла от 94°C – 1 min, AT – 45 s, 72°C – 45 s, последвано от окончателно удължаване на 72°C – 4 min, където AT е температурата на топене за всеки праймер, изчислена съгласно (Kochieva et al., 2002).

Анализът на получените ДНК фрагменти се извършва в 2% w/v агарозни гелове, приготвени съгласно Maniatis (Sambrook et al., 1987). Електрофоретичното разделяне се извършва в продължение на 1 час при 150 V в електрофоретичен буфер, съдържащ: 10.78 g/l TRIS, 5.50 g/l борна киселина и 0.74 g/l EDTA.Na₂.2H₂O.

Пипер

Праймерите, използвани за извършването на ISSR анализа (Таблица 8), бяха подбрани от набор от праймери, показали високи нива на възпроизводимост и потенциал за идентификация на полиморфизми в предишни изследвания в катедрата.

PCR реакциите се извършваха в следната реакционна смес: PCR buffer – 2.5 µl, dNTPs – 1.5 µl, ISSR primer – 1.5 µl, Taq polymerase – 0.12 µl, ДНК - 1 µl, dH₂O – 18.38 µl (общ обем 25 µl). Предварително 1 µl ДНК се разлива в епруветки, след което от крайната реакционна смес се взимат по 24 µl и се добавят към всяка една проба.

Използваният цикъл за PCR реакцията започва с денатурация при 94°C за 3 минути, последван от 40 цикъла на 94°C за 1 минута, Тх – 45 секунди, 72°C – 45 секунди, последвани от финално удължаване при 72°C за 4 минути (Тх – температура на топене изчислена по Kochieva et al., 2002).

Таблица 8. Характеристики на използваните праймери за провеждане на ISSR анализ при пипера.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (нд)	Температура на хибридизация (°C)
E5	(AC) ₈ C+TA	19	55
E8	(AC) ₈ C+TT	19	55

Пшеница

ISSR анализът е проведен с помощта на праймери (Gemmill and Grierson, 2021), които бяха налични в лабораторията по молекулярна биология на кат. ФРБГ към началото на изследването (Таблица 9).

Таблица 9. Последователности на ISSR праймерите, използвани за провеждане на PCR-анализ при пшеница.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 7	AG(8)CTG	19
Том14	AG(8)YT	18
Том 11	GA(8)YC	18
Том 3	CA(7)RG	16

PCR реакциите са извършвани в обем от 25 µl.

Пауловния

Общо 4 праймера бяха тествани върху екземпляри на тютюн с техните последователности, представени в Таблица 10. Наличието или отсъствието на всеки ISSR фрагмент се оценява като символ на двоична единица (1 = присъства, 0 = липсва).

Таблица 10. Последователности на ISSR праймери, използвани за извършване на PCR реакции с ДНК на пауловния

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 1	(CA)8AA+GG	20
ISSR 2	(CA)8AA+GC+T	21
ISSR 6	(AC)8C+TG	19
ISSR 7	(AG)8C+TG	19

Царевица

За анализ на хибридите от тази култура бяха използвани общо 4 праймера, които бяха тествани както върху смесена ДНК (от всички отгледани растения от всеки хибрид), така и върху всяко отделно растение, така че да бъде анализирана приложимостта на системата за ДНК профилиране на хибридите и за установяване на тяхната хомогенност. Характеристиките на използваните ISSR праймери са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Последователности на използваните ISSR праймери за анализ на царевични хибриди.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
ISSR 7	AG(8)CTG	19
Том14	AG(8)YT	18
Том 11	GA(8)YC	18
Том 3	CA(7)RG	16

Fusarium u Phytophthora

За изследване на двата фитопатогенни организма бяха използвани наличните към момента в Лабораторията по молекулярна биология 10 праймера. Последователностите им са представени в Таблица 12.

Таблица 12. Последователности на използваните ISSR праймери за анализ на фитопатогенните организми.

Наименование на праймера	ДНК последователност	Дължина (нд)
ISSR 1 (E1)	(CA)8AA+GG	20
ISSR 2 (E2)	(CA)8A A+GC+T	21
ISSR 3 (E3)	(GA)8C+TC	19
ISSR 4 (E4)	(AG)8C+TC	19
ISSR 5 (E5)	(AC)8C+TA	19
ISSR 6 (E6)	(AC)8C+TG	19
ISSR 7 (E7)	(AG)8C+TG	19
ISSR 8 (E8)	(AC)8C+TT	19
ISSR 9 (E9)	(AG)8C	17
ISSR 10 (E10)	(GA)8T	17

Кози

ISSR анализите бяха извършени чрез PCR реакции в QB-96 Thermal Cycler (Quanta Biotech, Лондон, Обединеното кралство). Общите нива на полиморфизъм бяха оценени от произведени мултилокусни анонимни доминантни маркери. Последователностите на ISSR праймерите, използвани за извършване на PCR реакции, са посочени в Таблица 13.

Таблица 13. Последователности на ISSR праймери, използвани за извършване на PCR реакции с ДНК на кози.

Праймер	ДНК последователност	Дължина (bp)
E7	AG (8)CTG	19
Том14	AG (8)YT	18
Том 11	GA (8)YC	18
Том 5	CT (8)RG	18

Анализ на скачването

Картата на памука е конструирана с помощта на софтуер MapMaker версия 3.0 (Lander et al., 1987). Всички двойки свързани маркери първо бяха идентифицирани с помощта на командата „group” ($LOD > 5$, честота на рекомбинация (RF) = 0.30). Командата „order” беше използвана минимум три пъти, за да се установи най-добрият рамков ред на маркерите в рамките на групите. Картата е конструирана с помощта на функцията за картиране Kosambi (Kosambi, 1943) с включена команда „error correction”. Последната команда взема предвид вероятността за всеки локус неговата алелна конфигурация по отношение на съседните маркери да произтича отчасти от грешки при въвеждане. Значителни корекции в общата дължина на картата може да са резултат от липсващи (2% в нашия случай) или грешни данни (Lincoln and Lander, 1992), както е наблюдавано по-рано при ечемик от (Castiglioni et al., 1998). Допълнителна информация, налична от подобни разположения на локуси на други карти или от предполагаеми хомеологични дублирания, беше използвана за тестване на допълнителни връзки на несвързани групи или индивидуални маркери към рамкови групи с помощта на командите „try” и „compare”. Накрая, подредените последователности на маркери бяха потвърдени с помощта на командата „ripple”.

Групите за свързване бяха начертани с използване на Visual Basic for Excel. Локализацията и визуализацията на клъстерите бяха оценени чрез сканиране на групите за свързване, използвайки интервал от 10 cM върху групите за свързване и чрез обединяване на региони с повече от 8 локуса.

Статистически анализ и използван софтуер

Амплифицираните фрагменти за AFLP, SSR и ISSR анализи бяха оценени за присъствие (1) или отсъствие (0) на съответните ивици в изследваните локуси.

1. Пробните алелни честоти в изследванията на SSR се изчисляват като $p_i = n_i / (2n)$, където n е броят на индивидите.
2. Индексът на генетичното разнообразие се изчислява за всеки праймер и всяка честота на модела, като се използва формула (1):

$$(1) \quad H = 1 - \sum p_i^2$$

където H е индексът на генетично разнообразие и p_i е честотата на проявление на съответния маркер (Nei, 1973).

3. Информационното съдържание на полиморфизмите (PIC) (Botstein et al., 1980) на маркера съответства на способността му да открива полиморфизми сред индивиди от съответната популация и колкото по-висок е този капацитет, толкова по-голяма е неговата стойност. Това е един от показателите за качество на маркера в генетичните изследвания. Стойностите на PIC за ко-доминантни маркери като SSR варират от 0 (мономорфен) до 1 (много силно информативен, с няколко алела с еднаква честота).

Информационното съдържание на полиморфизмите за всеки SSR (маркерен полиморфизъм) се изчислява по формулата $PIC = 1 - \sum p_i^2$, където p_i е честотата на i -тия алел за всеки маркерен локус на SSR.

По отношение на доминантни маркери (като ISSR) изчислението на информационното съдържание на полиморфизмите може да се опрости до :

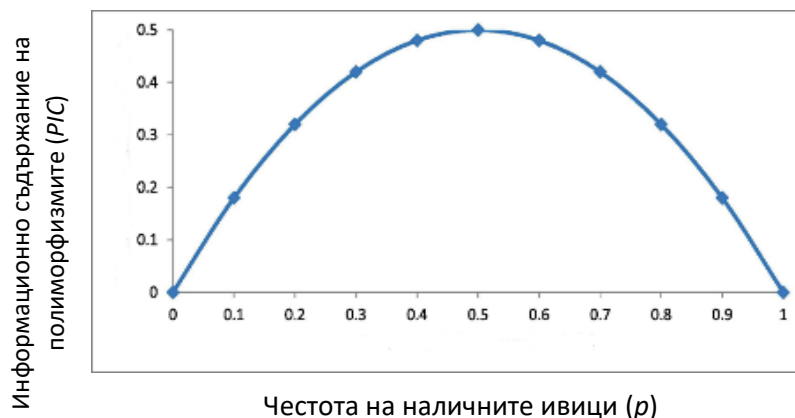
$$(2) \quad PIC = 2f(1-f),$$

където f е честотата на наблюдаваните ивици в гела; а $1-f$ е честотата на липсващите ивици (De Riek et al., 2001).

За доминантни маркерни системи използваме двоична матрица на присъствие и отсъствие на ивици в резултат на полиморфизма, разкрит от маркера. Ако разгледаме честотата на присъстващите ивици като p и честотата на отсъстващите като q , можем да стигнем до следното общо уравнение за оценка на информационното съдържание на полиморфизмите (PIC) :

$$(3) \quad PIC = 1 - (p^2 + q^2)$$

Това уравнение разглежда полиморфизма, базиран на честотите на хомозиготни индивиди за равновесието на Харди-Вайнберг, за разлика от (1), което отчита честотата на хетерозиготните индивиди. Това е опростено уравнение за бързо изчисляване на PIC (Serrote et al., 2020), чието теоретично разпределение на стойностите е представено на Фигура 1.



Фигура 1. Графично представяне на PIC стойностите като функция на честотите на налични и липсващи ивици в гел с PCR-генерирани фрагменти.

Както се вижда от фигурата, високите PIC стойности се получават, когато честотата на ивиците (присъстващи или липсващи) е около 0,5. Докато се движим наляво или надясно на графиката (когато разликата между честотите на присъствие и отсъствие на ивицата се увеличава), PIC стойностите намаляват.

4. Матрицата на разстоянието на Nei беше използвана за конструиране на дендрограмата с непретеглен групов метод на средно аритметични по двойки (UPGMA) с помощта на Power Marker 3.25 (Liu and Muse, 2005).
5. Молекулярните данни, събрани по време на настоящото проучване, бяха използвани за изчисляване на относителни генетични разстояния и създаване на йерархични клъстери със статистическия пакет „SPSS за Windows”.
6. За конструиране на референтната карта на генома на памука беше използван софтуерът MapMaker 3.0 (Lander et al., 1987).
7. Безплатният софтуер за картиране MapDisto (Lorieux, 2012) беше използван за QTL идентификация и картиране в сегрегиращата популация на памукови мутанти. Процедурата за изчисляване на QTL в рекомбинантни инбредни линии (RIL) беше използвана като най-подходяща за характеризиране на популация от сестрински линии, получени от мутационно въздействие.

8. Индексът на заболяемост (DSI) беше определян чрез скала за оценка 0–4 според процента на листата, засегнати от акропетална хлороза, некроза и увяхване (където: 0 = здраво растение, 1 = 1–33% засегната листна площ, 2 = 34–66% засегната листна площ, 3 = 67–97% засегната листна площ, 4 = 100% мъртви растения). За изчисляване стойностите на DSI беше използвана формула (4):

$$(4) \quad DSI = \frac{\sum N_i \times i}{4 \sum N_i} \times 100,$$

където N_i е броят на растенията с DSI оценка i .

Реакцията на растенията беше определена като резистентна (R), умерено резистентна (MR), или чувствителна (S) според стойностите на DSI. Образците бяха определяни като R, ако изчисленият DSI беше не по-висок от 25; MR, ако DSI беше в диапазона 25.1–45.0 и S, ако DSI беше 45.1 и по-висок (ElSharawy et al., 2015).

9. За нуждите на CAPS анализа бяха използвани следните софтуерни програми:

- Primer BLAST, хоствана от NCBI на адрес <https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Ye et al., 2012)
- Clustal Omega 1.2.1 за GNU/Linux (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011)
- GENTle 1.9.4 за Microsoft Windows (Manske, 2006).

Резултати

Фенотипно вариране

Памук

След 5 поколения на самоопрашване и възпроизвеждане в оранжерията и на полето линиите се считат за достатъчно хомогенни за определяне и сравняване на качествените свойства на влакното за идентифициране на QTL.

Тези, за които се установи, че са носители на множество ценни признаци на този етап, могат да бъдат използвани за започване на размножаване като селекционни материали. Преди да се продължи в тази посока, беше предприето подробно фенотипиране на основните технологични характеристики и влакното за да се идентифицират индивидите с потенциал за използване при механизизирано отглеждане.

Фенотипирането за технологичните характеристики разкри значителни разлики в потенциала за тяхното подобряване в рамките на изследваната популация (Таблица 14).

Таблица 14. Диапазон от технологични характеристики, наблюдавани в анализираниите М6 растения.

Признак	Кутийки/ растение	Тегло на кутийката	Добив (3 к/р)	Потенциал за добив	Висо- чина на расте- нието cm	Височина 1-ва плодна клонка cm	Дължина 1- ва плодна клонка cm
Стойност	бр.	g	kg/ha	kg/ha			
Минимум	1	3.56	1708	1140	53	8	2.0
Максимум	11	7.33	5323	10270	107	30	15.0
Средно	5	5.44	3516	5705	80	19	8.5
Нетретиран родител	6	5.21	2501	4915	82	10	7.0

Резултатите показват, че вариациите, генерирани от мутагенното третиране, са достатъчни за идентифициране на линии с подобрени технологични характеристики.

Средното тегло на кутийката също показва широки граници на изменение, вариращи от 3,56 до 7,33 g. От изследваните 132 потомства 60 имаха равно или по-ниско тегло на кутийката от средното, докато 31 потомства имаха значително увеличено тегло на кутийката. Комбинацията от повишено тегло на кутийката с увеличен брой кутийки се наблюдава при 13 от потомствата. Този род съчетание на полезни характеристики има голям ефект върху потенциала за добив.

За да бъдат добре адаптирани за механично бране, сортовете памук трябва да имат равномерно узряване, съчетано с добра ранозрелост. Прибирането на 3 кутийки/растение води до добиви от 2,2-2,5 t/ha (Таблица 14), които добиви са задоволителни за фермерите. Тъй като полетата трябва да бъдат подготвени за следващата култура, фермерите лесно се отказват от разликата до пълния потенциал на реколтата, така че комбинираният доход от последователните култури да се поддържа на оптимални нива.

За да бъде успешно механичното бране, целта е да се оберат първите 3 кутийки, така че да се извърши възможно най-ранното прибиране. Както е представено в Таблица 14 основният за страната сорт разполага първата си плодна позиция на 10 cm от земята, което по същество я прави недостъпна за механично прибиране. Резултатите от мутагенното третиране показват, че този признак е повлиян както положително, така и отрицателно в популацията. Наблюдаваното изменение на този признак в негативна посока беше умерено (спад от само 2 cm). От друга страна при някои растения М6 беше постигнато съществено подобрение – много висока позиция на първата плодна клонка (Фигура 2, Таблица 14). Фигура 2 показва, че увеличението във височината на първата плодна позиция

могат да дойдат в резултат на различни ефекти от мутагенното третиране. Изборът на потомства с комбинация от желани характеристики за механично прибиране на реколтата в нашия случай означава избор на такива, които проявяват едновременно високо положение на първите плодни клонки, голям брой зрели кутийки в края на вегетационния период и високо средно тегло на кутийките.

Освен това е желателно първата плодна клонка да е не само на високо място, но и да се развива нагоре от тази позиция, така че първата зряла кутийка да е оптимално позиционирана за механично прибиране. Не само че плодната клонка трябва да бъде на правилното място, но дължината ѝ трябва да се държи под контрол, тъй като клонките, които са твърде дълги, се огъват към земята под тежестта на развиващите се кутийки. Такова огъване може да доведе до позициониране на плода дори по-ниско от позицията, в която се е развила самата клонка. Следователно здрави клонки с дължина 7-10 см са най-желани за тази позиция (Фигура 2, Таблица 14).

Освен агротехническите характеристики, успешният нов сорт трябва да притежава добри качествени характеристики на влакното. Въпреки че не влияят пряко на цената, която земеделският производител получава за реколтата, тези характеристики влияят значително върху ефективността на операциите по памукопреработване и по този начин са основен фактор при вземането на решения за източниците на суровини за фабриките за памукопреработване. Следователно качеството на влакното също беше основен показател, проследен в нашето проучване.

Фенотипирането в популацията на свойствата на влакното разкри значителни разлики в качеството му (Таблица 15).



Фигура 2. Фенотипно вариране, наблюдавано в М6 поколение. Най-вляво е нетретираният родител, който ясно показва комбинацията от добра ранозрелост и потенциал за добив с нежелана позиция на първата плодна клонка.

Таблица 15. Диапазон от качествени характеристики, наблюдавани в маркираните М6 растения.

	микронер	здравина	дължина	равномерност	еластичност
минимум	3	23,8	23,3	79,3	5,9
Максимум	6,2	34,9	30,1	86,4	15,2
Средно	4,3	28,8	26,8	83,2	8,9
Чирпан 603 нетретиран	4.9	27.6	26.6	83.5	9.6

Резултатите показват, че генерираният полиморфизъм е достатъчен за идентифициране на локуси, свързани с характеристиките на качеството на влакното. Общата средна стойност за микронера например е намалена с 0,6 единици, с най-ниска наблюдавана стойност от 3,0. За разлика от микронера, общата средна стойност за здравината на влакното беше повишена (с 1,2 g/tex). Потомството с най-ниска стойност има и най-нисък микронер, така че варирането на признака в този случай може да се отдаде на непълното развитие на влакното.

В другия полюс имаше четири потомства със здравина на влакното, варираща съвсем слабо (34,2-34,9 g/tex). Микронерът на тези потомства също варира малко (4,5-4,8), докато дължината на влакното е по-променлива (24,8-27,3 mm). Интересното е, че еластичността на потомствата с най-дълги влакна (27.2-27.3) в рамките на тази група е близко до това на родителския генотип и варира много малко (7.7-8.1), което показва, че в тези потомства единствената засегната характеристика е здравината на влакното.

В съответствие с предварителните очаквания, дължината на влакното беше повлияна както положително, така и отрицателно с крайности, равномерно разпределени от средната стойност. Три от четирите потомства с най-къси влакна имат висок до много висок микронер (4,7-6,2) и равна или по-висока здравина на влакното спрямо родителския генотип (27,2-29,2g/tex), което показва, че тези потомства са достигнали пълна зрялост и тяхната дължина на влакното всъщност се влияе отрицателно от мутагенното третиране. В другия край на диапазона картината не беше толкова ясна. Потомството с най-дългото влакно (30,1 mm) имаше здравина (26,8 g/tex), еластичност (10,2) и равномерност (83,3%), по същество равни на тези на родителя, докато неговият микронер беше значително намален (до 3,9). Следващите три потомства с най-дългото влакно (29,0-29,3 mm) имаха значително повишена здравина (28,1-31,4 g/tex), докато микронерът беше умерено до значително намален (3,8-4,5).

От другите изследвани характеристики на влакното еластичността представлява най-голям интерес като характеристика от значително значение

за преденето на прежда. По отношение на еластичността имаше едно потомство, проявяващо необичайна стойност. Както е показано на Фигура 2, в едно от потомствата този признак имаше стойност 15.2, като по този начин се отклонява положително с повече от 5 единици от родителския генотип и с повече от 6 от средната стойност на популацията. Същото потомство имаше много добра дължина на влакното (28,0 mm), здравина (28,5 g/tex), равномерност (82,6) и микронер (4,3), което го прави много добър генотип за бъдещо развитие като кандидат-сорт, носещ множество положителни характеристики на влакното.

Резултатите от групирането на генотиповете въз основа на пълния набор от информация за техните качествени и агротехнически характеристики са представени на Фигура 3. Моделът на разпределение в дендрограмата би бил труден за обяснение въз основа само на анализа на комбинациите от признаци във всяко потомство. Например, най-горния клъстер от 10 потомства съчетава растения със средна до голяма височина на растенията (75-95 cm), къси до много къси влакна (23-27 mm) и нисък потенциал за добив (2-4 t/ha). Потомствата в другия край на дендрограмата също имат къси влакна, нисък потенциал за добив и варират според височината на растението. Нито една от двете групи няма други наистина отличителни характеристики. Следователно обясняването на разделението в двете групи би било трудно, ако не и невъзможно, без резултатите от PCA .

На първо място PCA показва, че различните изследвани характеристики имат умерена до ниска тежест при определяне на общото разпределение в дендрограмата. Както Таблица 16 ясно показва, варирането, обяснено с натоварванията на първите два компонента, е по-малко от 50%. Когато остатъчното вариране е толкова високо, групирането на генотиповете е трудно да се идентифицира чрез емпирични наблюдения и само с помощта на опита на селекционера.

Истинската полезност на PCA става очевидна, когато се анализират внимателно данните от Таблица 17. Както показва таблицата, характеристиките с най-високи натоварвания върху първия основен компонент са броят на кутийките, теглото на семената на памука и потенциала за добив. Общото вариране, обяснено от този компонент, обаче е около 31%. Следователно е необходим анализ на натоварванията на характеристиките спрямо втория основен компонент, при което теглото на кутийките и добивът (определен на базата на 3 кутийки/растение) се появяват като признаци с най-високо натоварване на втория компонент. Фактът, че първите два компонента обясняват по-малко от 50% от общото вариране, налага да се обърне внимание на признаците, които имат най-

голямо натоварване спрямо третия основен компонент и това са височината на растението и височината на 1-вата плодна клонка. Включването на третия компонент води до обяснение на повече от 60 % от общото вариране.

Таблица 16. Натоварвания на компоненти и процент от общото вариране, обяснени чрез анализ на главните компоненти на генотипното разнообразие в М6 популацията.

Компонент	Обяснена обща вариране					
	Първоначални собствени стойности			Извлечени суми на квадратни натоварвания		
	Общо	% от отклонението	Кумулативен %	Общо	% от отклонението	Кумулативен %
1	3,447	31,333	31,333	3,447	31,333	31,333
2	1,876	17,055	48,388	1,876	17,055	48,388
3	1494	13,581	61,969	1494	13,581	61,969
4	1,428	12,982	74,951	1,428	12,982	74,951
5	1,155	10,496	85,446	1,155	10,496	85,446
6	,939	8,533	93,980			
7	,474	4,310	98,289			
8	,163	1,482	99,771			
9	,025	,229	100 000			

Метод на извличане: Анализ на основните компоненти.

Тъй като работим със сегрегираща популация, произхождаща от мутагенно третиране, трябва да се очакват ниски компонентни натоварвания, защото ефектът от третирането не е насочен и следователно признаците са засегнати както в положителна, така и в отрицателна посока.

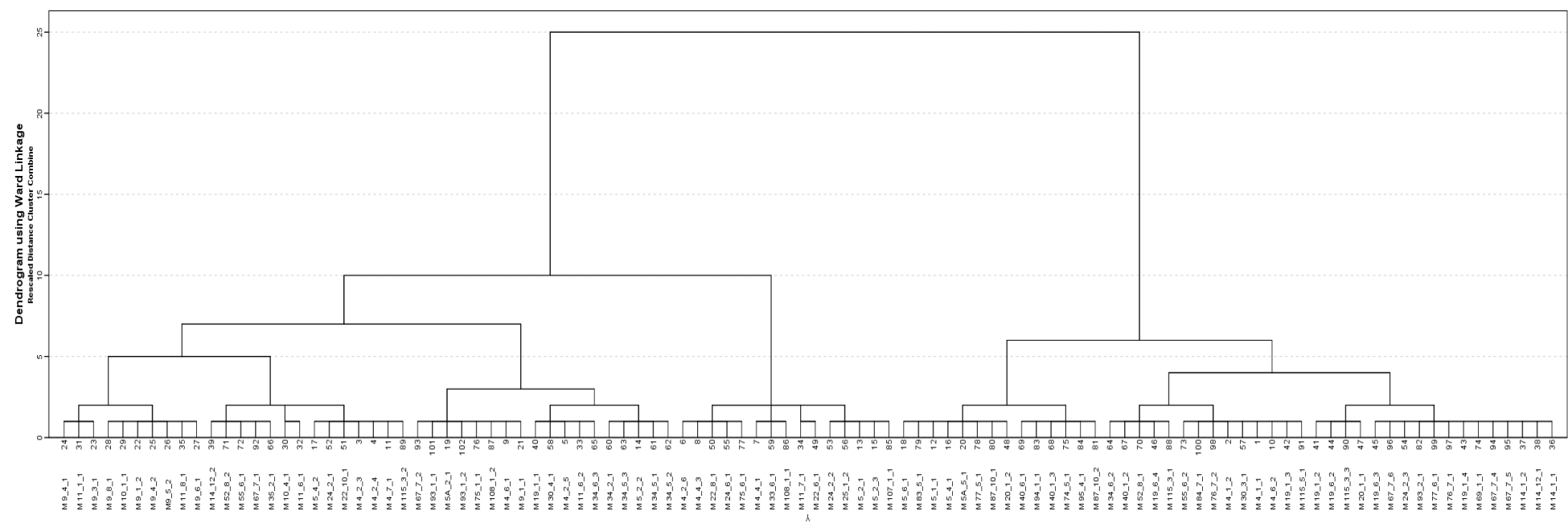
Наблюдението, че броят на кутийките, теглото на кутийката на памука, общият потенциал за добив, теглото на семето, добивът от 3 кутийки/растение, височината на растението и височината на 1-вата плодна клонка са характеристиките с най-високи натоварвания, предполага, че в популацията могат да се очакват потомства, комбиниращи едновременно подобрения в повечето (ако не във всички) от тези признаци. Освен това те трябва да се групират в един (или два тясно свързани) клъстера на дендрограмата.

В действителност анализът на клъстерирането на потомствата (Dimova and Vojinov, 2001) разкрива, че последната група от левия най-голям клъстер обединява потомства с висок потенциал за добив (7-10 t/ha), средно до голямо тегло на кутийката (5-7 g), бързо начално развитие (22-23 дни от 1-ви същински лист до цъфтеж) и средна до голяма височина на 1-ва плодна клонка. В комбинация с добрата дължина на влакното (28-31 mm) тази група представлява най-обещаващият набор от потомства в нашия експеримент. В рамките на тази група потомствата М_5_2_1

и М_5_2_3 имат микронер 4,07 и 4,43, здравина на влакното 32,9 и 37,7 и равномерност 89,7 и 89,1. Комбинацията от тези характеристики прави тези две потомства такива с най-висок потенциал да се превърнат в нови сортове.

Таблица 17. Относителна тежест на признаците по извлечен компонент от PCA.

Матрица на основните компоненти					
Признаци	Основни компоненти				
	1	2	3	4	5
Брой кутийки	0,965	0,073	0,028	0,192	0,069
Тегло на семената	0,886	0,333	0,091	0,279	0,114
Тегло на кутийката	-0,546	0,791	0,170	0,191	0,024
Добив 3 кут./растение	-0,546	0,791	0,170	0,191	0,024
Потенциал за добив	0,886	0,333	0,091	0,279	0,114
Височина на растението	0,092	-0,364	0,685	-0,070	0,379
1-ва плодна клонка височина	-0,343	-0,119	0,542	0,017	0,605
1-ва плодна клонка дължина	0,077	-0,140	0,274	0,273	-0,358
Котиледон до 1-ви истински лист	-0,022	0,01	-0,682	0,041	0,593
Котиледон до цъфтеж	-0,385	-0,257	-0,309	0,746	0,256
1-ви същински лист до цъфтеж	-0,265	-0,408	0,140	0,723	-0,259



Фигура 3. Групиране на генотипове въз основа едновременно на технологични и на качествени характеристики на влакното.

Домати

Използвахме 8 сорта домати и линии с големи вариации в характеристиките на плода, включително размер (голям, среден, малък), форма (кръгла, плоско кръгла, овална), цвят (жълто-оранжев, червено-оранжев, червен, червено-виолетов, розово, пурпурно-черно) и др., както и растежен хабитус (детерминантен и индетерминантен). Въпреки това, високата морфологична вариабилност не винаги се отразява на молекулярно ниво (Wang et al., 2006) и подробни генетични изследвания на молекулярно ниво са много необходими, когато се планират кръстоски между образци от елитна зародишна плазма.

Изследваните сортове и линии домати се характеризират с разнообразие в основните химични показатели (Таблица 18).

Таблица 18. Химични показатели на плодовете на сортове и линии домати.

Сорт / линия	Сухо Вещество	Аскорбинова киселина	Титруеми органични киселини	Общи багрила	Ликопен	Бета-каротен
	Re (%)	(mg %)	(%)	(mg %)	(mg %)	(mg %)
Пловдивска каротина	5.8 ± 0.5	54.14 ± 5.53	0.35 ± 0.02	9.79 ± 1.99	4.17 ± 1.04	4.76 ± 0.82
L21β	5.3 ± 0.8	30.57 ± 4.87	0.38 ± 0.05	4.79 ± 0.99	-*	4.46 ± 0.92
L1116	4.9 ± 1.0	33.55 ± 4.91	0.35 ± 0.08	6.85 ± 1.22	6.15 ± 1.36	0.28 ± 0.19
L1140	7.0 ± 0.3	40.80 ± 3.33	0.54 ± 0.05	5.21 ± 0.49	2.80 ± 0.45	2.12 ± 0.62
ИЗК Аля	9.7 ± 0.7	60.09 ± 6.91	0.66 ± 0.05	9.81 ± 1.01	9.23 ± 1.18	-
L984	5.1 ± 0.2	25.06 ± 1.38	0.38 ± 0.05	9.03 ± 0.89	8.64 ± 1.16	-
L975	5.4 ± 0.5	19.23 ± 2.69	0.37 ± 0.04	7.48 ± 0.52	7.08 ± 0.69	-
L53β	5.4 ± 0.34	27.59 ± 2.81	0.37 ± 0.03	3.68 ± 0.39	0.65 ± 0.10	2.78 ± 0.34

* - количеството е под прага на чувствителност на метода

Кози

На базата на проведеното проучване в популациите на двете автохтонни породи кози (Калоферска дългокосместа коза и Българска витороба дългокосместа коза), отглеждани в Югозападна България, могат да бъдат диференцирани няколко базови окраски.

Черно пигментирана космена покривка. Космената покривка е равномерно, наситено черна, без никакви изсветляващи зони по тялото. Среща се и при двете автохтонни породи. Използвайки класификацията на окраските при козите на (Adalsteinsson et al., 1994), имаме налице типично еумеланинова пигментация. С възрастта при изцяло черните

екземпляри се наблюдават и сиви влакна по дължината на гръбната линия, особено изразени в областта на крупата.

Рижо-кафяво пигментирана космена покривка. Цвета при този тип пигментация варира от тъмно шоколадово кафяво до светло охрено. Характерно за тази окраска е, че лигавиците на устните, носа и клепачите са наситено керемидено кафяви. Липсва какъвто и да е черен пигмент. Среща се и при двете автохтонни породи като е нужно да се отбележи, че яретата се раждат кафявочервеникави и впоследствие космите по тялото могат да изсветлят.

Сребристо сиво пигментирана космена покривка. Космената покривка се състои от равномерно разпределени бели и черни влакна, придаващи равномерен сребристо сив оттенък на този тип окраска. Може да варира от по-светло до по-тъмно в зависимост от съотношението на белите и черните влакна. Наблюдава се изсветляване около очите към муцуната, вътрешната част на ушите и задната част на крайниците. Среща се широко и при двете автохтонни породи. Отговаря на тип пигментация определена от Agouti локуса, и обозначена като „striped grey” по (Adalsteinsson et al., 1994).

Пигментация тип „барза”. Изключително специфична окраска която местното население определя с наименованието „барза” и представляваща комбинация на зонално светло оцветяване на предната половина на тялото, като задната е тъмна – черна, оформяща „тъмно/черно наметало” върху крупата и поясницата. Поради дългата космена покривка при двете местни породи черното „наметало” може да се спуска почти до земята в задната част на тялото. Козината по долната част на краката е тъмна до черна. На лицевата част на главата има много специфични надлъжни черни ивици – едната над окото, а другата под него. Известно вариране се наблюдава при оцветяването на светлата зона на тялото при тази окраска. Тя може да бъде от почти кремаво-бяла до керемиденочафеникава.

Черно „гаресто” пигментирана космена покривка. Характерна форма на пигментация на космената покривка при козите, при която на черен фон на тялото има специфично локализирани петна с по светъл кафеникав цвят. Специфичните локализации на светлите петна са по лицевата част на главата, вътрешната страна на ушите, долната част на крайниците, корема и опашката. По-светлите петна могат да варират по цвят от наситено керемидено кафяво, до почти бяло. Тази окраска се среща основно при Българската виторога дългокосместа коза. Изключително рядко се наблюдава в популацията на Калоферската дългокосместа коза, и много често се възприема като признак за кръстосване. Някои автори

в зависимост от големината и мястото на разпределение на светлите петна по тялото, определят тази окраска като „black and tan”, обусловена от Agouti локуса.

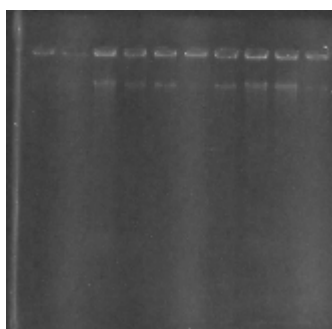
Междинни форми на пигментация на космената покривка. Генетичните взаимодействия под влияние на Agouti локуса определят изключително разнообразие в пигментацията, съчетавайки различни елементи от базовите окраски. Поради това съществуват редица форми на пигментация на космената покривка на автохтонните кози, съчетаващи елементи от основните типове окраски, и определянето им се затруднява значително. Това разнообразие от междинни форми е изразено в значителна степен за популацията на Българската вито̀ро̀га дългокосместа коза.

Всички посочени по-горе вариации на пигментацията правят фенотипното характеризиране на индивидите твърде сложно и в много случаи ненадеждно. Ето защо разработването на по-надеждни начини за установяване на генотипната принадлежност на индивидите е от особена важност за такива местни породи животни.

Екстракция на ДНК

Памук

Непосредствено преди цъфтежа бяха подбрани по 10 бр. типични растения и от тях беше направена екстракция на ДНК с помощта на стандартния набор химикали на Amersham-Pharmacia (PhytoPure DNA extraction kit). Резултатите от екстракцията са представени на Фигура 4. Както се вижда от фигурата, получената при екстракцията ДНК е със сходно качество (липса на деградирани фрагменти) и в приблизително еднакви количества от повечето екстракции. Изключение представляват № 1, 2, 6 и 10, при които или количеството на получената ДНК е по-малко (№ 6 и 10) или практически липсва (№ 1 и 2). От такива растения се наложи провеждането на допълнителна ДНК екстракция за да бъде получено достатъчно количество и качество на екстрахираната ДНК, така че



Фигура 4. Резултати от екстракцията на тотална геномна ДНК от млади листа на сорт Чирпан 603

провеждането на последващите анализи да бъде възможно с ДНК от всички маркирани растения.

Домати

Процедурата за екстракция на ДНК доведе до получаване на висококачествена геномна ДНК както от култивирани, така и от генотипове на диви домати. В повечето случаи беше изолирана Между 300 и 500 μg геномна ДНК. Когато количеството или качеството на получената ДНК е счетено за незадоволително, извличането беше повторено, така че тези критерии да могат да бъдат изпълнени.

Тютюн

Първоначално бяха подбрани растения и от тях беше изолирана и пречистена ДНК с помощта на стандартния набор химикали на Amersham-Pharmacia (PhytoPure DNA extraction kit).

Ечемик

Тотална геномна ДНК е извлечена от 24 образца, включени в изследването. В повечето случаи качеството на получената ДНК е достатъчно добро. Когато количеството или качеството на ДНК се считат за незадоволителни, екстракцията беше повтаряна.

Пипер

От всички образци бе изолирана висококачествена геномна ДНК с помощта на стандартния набор химикали на Omega Bio-Tek. Получената при екстракцията ДНК бе със сходно качество (без деградирани фрагменти) и в приблизително еднакви количества (в повечето случаи между 300 и 500 μg геномна ДНК). Когато количеството или качеството на получената ДНК се считаше за незадоволително, екстракцията се извършваше отново, за да се удовлетворят посочените параметри.

Пауловния

В началото на вегетацията бяха подбрани растения и от тях беше изолирана и пречистена ДНК с помощта на стандартния набор химикали на Amersham-Pharmacia (PhytoPure DNA extraction kit).

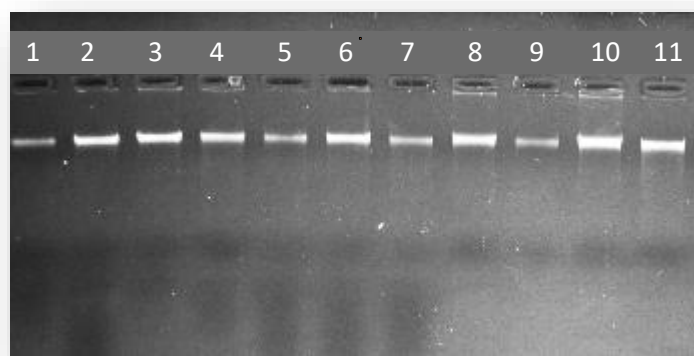
Царевица

ДНК от използваните генотипове беше изолирана и пречистена с помощта на стандартния набор химикали Plant DNA extraction mini kit на

фирма BioOne. Получената при екстракцията ДНК беше със сходно качество и в приблизително еднакви количества от всяка една екстракция.

Пшеница

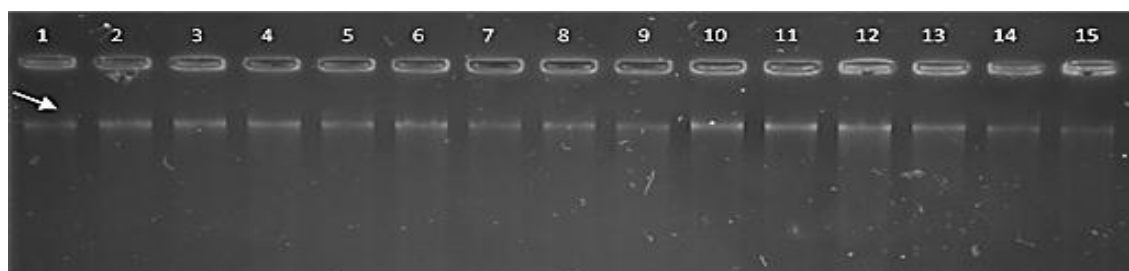
Първоначално беше извършен подбор на изходни форми и по време на вегетацията от тях беше изолирана и пречистена ДНК с помощта на стандартния набор химикали Plant DNA Preparation Kit. Резултатите, представени на Фигура 5 показват, че получената при екстракцията ДНК е с подходящо качество (липса на деградирани фрагменти) и в приблизително еднакви количества от всяка една екстракция.



Фигура 5. Резултати от екстракцията на тотална геномна ДНК от млади листа на 11 от изследваните сортове. (1-Предел, 2-Авеню, 3-Ряждур, 4-Сая, 5-Терес, 6-Солехио, 7-Енола, 8-Пибрак, 9-Софру, 10-Хеликс, 11-Флавор).

Кози

За ISSR анализ геномна ДНК от двата генотипа на кози беше изолирана със стандартния комплект innuPREP DNA (AnalyticalJena), съгласно препоръките на доставчика. Изолирането на достатъчно количество с геномна ДНК с добро качество беше постигнато, когато бяха използвани 15 космени фоликула (Фигура 6), което позволи успешни ISSR анализи покъсно. В резултат на това се получават общо 300 до 500 μg геномна ДНК. Когато количеството или качеството на получената ДНК се счита за недостатъчно, процедурата за извличане на ДНК се повтаря до получаване на адекватни резултати.



Фигура 6. Резултати от извличането на геномна ДНК от космени фоликули с innuPREP DNA Kit (стрелката сочи към позицията на геномните ДНК фрагменти).

Нива на полиморфизъм на молекулните маркери и профили на образците

Ко-доминантни маркери

Памук

Приблизително 90% от RFLP сондите и SSR праймерите разкриха полиморфни ивици за поне един локус между двата родителя, „Guazuncho 2” и „VN8”. Сред 377 полиморфни RFLP и SSR маркери, за които може ясно да се направи извод за определяне на ивиците, 306 (81%) са дублирани, потвърждавайки високата еволюционна скорост на дублиране в генома на тетраплоидния памук. Две трети от тези дублирания са или полиморфни за двата локуса (четири ивици във F1), или полиморфни в един локус и мономорфни във втория (три ивици във F1). Шестдесет и три от полиморфните RFLPs и SSRs се предполага, че са от тип един локус (една единична и различна ивица във всеки родител).

Общо 15 двойки SSR праймери бяха скринирани за полиморфизъм между линиите за провеждане на анализ на молекулярните маркери в мутантната популация. От тях 5 не генерираха никакви полиморфизми, 6 генерираха 2 полиморфни ивици и 4 генерираха повече от 2 полиморфни ивици. В изследваната популация бяха идентифицирани общо 27 полиморфизми, повечето от които имаха или единични, или много малко на брой (2-6) ивици.

Домати

Общо 165 общодостъпни микросателитни маркера за домати бяха използвани за оценка на генетичното разнообразие в набор от 8 български инбредни линии и сортове. Сред тях 100 бяха геномни и EST-SSR маркери от SOL Genomics Network (<http://solgenomics.net>); 32 бяха TGS и TES маркери от Kazusa Tomato Genomics Database (<https://marker.kazusa.or.jp/app/crop.php?crop=tomato>); 16 бяха SLM, разработени от закотвени BAC клонове на хромозоми 6 и 12 (Geethanjali et al., 2011); 16 са TMS и EST маркери, разработени от (Areshchenkova and Ganai, 2002) и един SSR - LEMDDна на (Smulders et al., 1997). Маркерите бяха избрани да покриват 12-те хромозоми с минимум 7 SSR на хромозома и да бъдат разположени близо до вече публикувани QTL и гени, отговорни за фенотипните вариации в качеството и други морфо-физиологични характеристики.

В това изследване са използвани стандартизирани условия на PCR при две различни температури на топене (50°C и 63°C), което позволява по-нататъшно амплифициране на маркери, които да бъдат доразработени за мултиплексна амплификация.

Стандартизираните PCR условия бяха постигнати чрез извършване на начална стъпка на оптимизация за всяка концентрация на праймер, специфичен за локус (20, 30, 50, 60 и 80 nM). Регулирането на концентрацията на специфичния за всеки локус праймер позволява PCR специфичността и добива да бъдат контролирани. Тези условия също помагат да се предотврати неспецифичното свързване на локус-специфични праймери по време на първите няколко PCR цикъла. Нашият тест показва, че праймерите за всички геномни SOL SSRs, TES, TGS, TMS, EST и LEMDDNa маркери дават ясни продукти на амплификация при концентрация от 20-30 nM, докато SLM праймерите показват най-добра амплификация при концентрация от 60 nM.

В нашето проучване само пет от 165 праймера (3.03%) не успяха да амплифицират очакваните PCR фрагменти. Седемдесет и девет (49,38%) маркера амплифицират мономорфни ивици, докато останалите 81 (50,62%) маркера генерират полиморфни.

В това проучване, използвайки новото флуоресцентно базирано SSR генотипиране, разработено по протокола на (Hayden et al., 2008) и (Tsonev et al., 2013) съобщихме за липса на амплификация само в няколко SSR локуса в сравнение с други проучвания. Например, (Benor et al., 2008) съобщават, че 31,7% от 60-те използвани SSR не са успели да амплифицират очакваните PCR продукти, докато (El-Awady et al., 2012) представят общо 10% SSRs, които не са в състояние да произведат ампликони.

В рамките на настоящото изследване бяха идентифицирани общо 299 алела в 160 SSR локуса. Средният PIC за всички 160 SSR маркера беше 0.196 със стойности, вариращи от 0.00 за маркери, генериращи мономорфни ивици, до 0.786 за маркера SLM6-7. Броят на алелите на локус варира от 1 до 6 със средно 1,869 алела на локус (Таблица 19).

Таблица 19. Брой на амплифицираните микросателитни локуси, общ и среден брой алели, генно разнообразие (GD), наблюдавана хетерозиготност (Ho) и съдържание на полиморфна информация (PIC).

	Брой амплифицирани локуси	Брой алели	GD	Ho	PIC
Общо	160	299	35,553	6,625	31,439
Средно		1,869	0,222	0,041	0,196

Тези резултати показват, че алелните вариации в изследваните сортове и линии домати са ограничени.

В нашето изследване по-голямата част от полиморфните SSR локуси (55.55%) генерираха два и три (29.63%) алела. AT и TA са най-често

срещаните типове повтори (съответно 22,22% и 17,28%), следвани от CGG, TTC и AAG, всеки с по 3,7%. В противоречие с докладите на (He et al., 2003) и (Benor et al., 2008), които не откриват връзка между PIC и броя на нуклеотидите на повторение, нашето изследване е в корелация с тези на (Blair et al., 1999) и (Jones et al., 2001). И двамата автори съобщават, че нивото на полиморфизъм в тринуклеотидните повтори е по-ниско от това в динуклеотидните повтори в ориза и райграса.

Използваните тук SSR маркерни групи показват различни нива на полиморфизъм в изследваните 8 български генотипа домати (Таблица 20).

Таблица 20. Общ брой полиморфни локуси, открити с различни групи маркери.

Групи маркери	Брой микросателитни локуси	Брой полиморфни локуси	Полиморфни локуси (%)
TMS и EST	15	10	66,66%
CCP	99	50	50,51%
SLM	15	15	100,00%
TGS и TES	30	5	16,66%
LEMDDNa	1	1	100,00%
Общо	160	81	50,62%

Най-високото ниво на полиморфизъм (100%) е генерирано с SLM маркери, разработени от закотвени BAC клонове на хромозоми 6 и 12 (Geethanjali et al., 2011). Всички 15 амплифицирани SLM локуса бяха полиморфни. Сред използваните 99 геномни и EST-SSR маркери от SOL Genomics Database (<http://solgenomics.net>) 50,51% са полиморфни, докато TMS и EST SSR маркери на (Areshchenkova and Ganai, 2002) показват 66,66% полиморфизъм. Най-ниското ниво на полиморфизъм (16,66%) се наблюдава в TGS и TES локусите (<https://marker.kazusa.or.jp/app/crop.php?crop=tomato>). Очаква се най-новите маркери да бъдат по-подходящи за разграничаване на елитна доматиена зародишна плазма и нейните диви роднини или местни видове. Тъй като някои от използваните тук маркери са разположени близо до QTL за качествени признаци и гени за някои морфо-физиологични характеристики (Mazzucato et al., 2008), тяхното по-нататъшно използване в асоциативни проучвания е силно препоръчително.

От използваните 160 SSR маркери, най-високо полиморфни са SLM маркерите с произход от припокриващи се BAC клонове, включващи части от хромозоми 6 и 12, следвани от TMS (Areshchenkova and Ganai, 2002) и SSR (<http://solgenomics.net>), и най-ниско полиморфни - TGS и TES маркерите (<http://marker.kazusa.or.jp/Tomato>). Последните показват по-високо ниво на полиморфизъм между дивите родственици и културния

домат, отколкото в рамките на вида *Lycopersicum esculentum* (Shirasawa et al., 2010) и биха могли да се използват за доказване на интрогресии в случай на кръстоски между тях. В настоящето изследване с тази група маркери, полиморфизъм се наблюдава само в 5 локуси от общо 30 амплифицирани (общо 16.6%), за 3 от които е известно, че са локализирани в съседство с гени, кодиращи *Glucan endo-1 3-beta-glucosidase 3*, *Alcaline ceramidase 3-like* и *Exocytosol complex component 7* (TES1276, TGS1606 и TES1711), а за другите два (TGS914 и TGS959) – до/в гени, кодиращи все още неизвестни белтъци.

Полиморфизъм между изследваните генотипове с групата SSR маркери (общо 99 амплифицирани) от американската база данни (<http://solgenomics.net>) е установен в 50 локуса.

Изключително интересна е групата на SLM маркерите (Geethanjali et al., 2010; Geethanjali et al., 2011). От анализиранияте 15 локуси, всички показват полиморфизъм при изследваните генотипове.

Доминантни маркери

Памук

След получаването на геномна ДНК с необходимите характеристики работата продължи с търсенето на наследствени детерминанти, за които да се установи близка асоциация с наблюдаваното фенотипно вариране на целевите признаци (ранозреелост, качество на влакното и технологични признаци). Поради липса на предварителна информация за потенциалната локализация на последователностите, които определят наблюдаваното фенотипно вариране, като първи етап беше предприет скрининг на геномите с полиморфни анонимни маркери, които да ги покрият в максимална степен. 64-те AFLP праймерни комбинации дават общо 1294 полиморфни ивици (т.е. специфични за "Guazuncho 2" или "VH8"), от които 726 са специфични за "VH8" и, следователно, информативни за популацията от възвратно кръстосване (Таблица 21). Като се имат предвид средно 91 ивици на праймерна двойка, полиморфизмът, разкриван от AFLP между двата родителя *G. hirsutum* и *G. barbadense*, е 22%. Бяха отчетени между 2 и 27 (средно 11,3) информативни AFLP маркера на двойка праймери (Таблица 21). Нямаше корелация между общия брой ивици и броя на полиморфните. Наблюдава се положителна корелация между броя на полиморфизмите и съдържанието на А/Т в +3/+3 EcoRI и MseI селективните нуклеотиди, което потвърждава резултатите на (Keim et al., 1997) и (Young et al., 1999). Средният брой полиморфни AFLPs е 13.8, 11.9 и 7.8, съответно спрямо 0.66, 0.5 и 0.33% съдържание на А/Т.

От 726 информативни AFLP, 576 могат да бъдат надеждно потвърдени в популацията BC1 и следователно използвани за анализ при картирането.

Таблица 21. Резултати от използването на AFLP праймерни комбинации.

EcoRI праймер	Селективни нуклеотиди	MseI праймер	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	Общо	Средно
			CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT		
E1	AAC	Полим.	11	14	8	11	19	16	9	11	99	12.4
		Общо	142	98	105	136	121	113	91	132		117
E2	AAG	Полим.	9	9	13	15	17	27	16	13	119	14.9
		Общо	157	110	105	148	142	128	89	156		129
E3	ACA	Полим.	16	13	8	15	24	16	18	16	126	15.8
		Общо	122	100	72	129	112	89	78	115		102
E4	ACT	Полим.	10	15	7	14	12	10	11	8	87	10.9
		Общо	106	81	96	92	84	76	58	91		86
E5	ACC	Полим.	7	9	11	10	12	11	7	4	71	8.9
		Общо	99	71	53	93	92	69	67	83		78
E6	ACG	Полим.	3	6	5	11	20	16	7	10	78	9.8
		Общо	59	88	69	49	59	60	71	65		65
E7	AGC	Полим.	13	10	2	13	15	10	4	13	80	10
		Общо	82	68	67	91	69	58	77	91		75
E8	AGG	Полим.	16	5	6	3	8	11	5	12	66	8.3
		Общо	103	65	60	89	76	56	59	71		72
	Общо	Полим.	85	81	60	92	127	117	77	87	726	
	Средно	Полим.	10.6	10.1	7.5	11.5	15.9	14.6	9.6	10.9		11.3
		Общо	109	85	78	103	94	81	74	101		91

AFLP маркерната система беше използвана и за анализ на разнообразието в изходния български сорт Чирпан 603 и неговото M1 мутантно поколение.

Анализът при тази група индивиди беше съсредоточен върху търсенето на наследствени детерминанти, за които да се установи близка асоциация с наблюдаваното фенотипно вариране на целевите признаци. Поради липса на предварителна информация за потенциалните ефективни последователности, като първи етап беше предприет скрининг на генома с полиморфни анонимни маркери, които да го покрият в максимална степен.

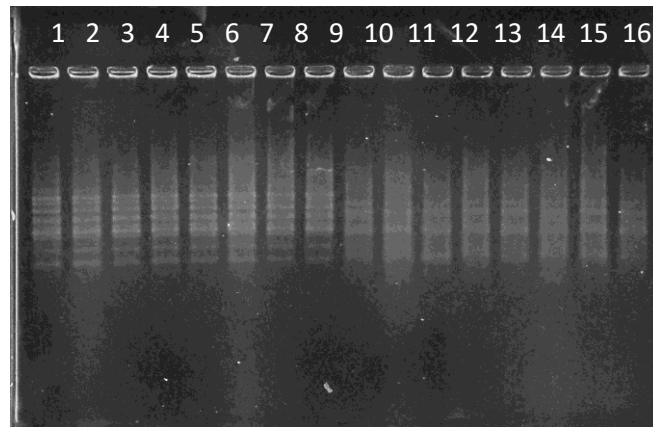
Поради причини описани другаде (Bojinov & Lacape, 2003) за идентифициране на ДНК полиморфизми между двата генотипа първоначално беше избран AFLP анализ. Бяха използвани четири EcoRI/MseI праймерни двойки, които демонстрираха ниски нива на полиморфизъм между генотиповете. Този резултат е в пълно съответствие с ниските нива на полиморфизъм, наблюдавани в популация от над 160 генотипа от генбанката на CIRAD, проучени с всички възможни 64 праймерни комбинации от Life Technology AFLP™ analysis system I (наши непубликувани

изследвания). За да може да бъдат определени информативните полиморфизми са необходими резултатите от измерванията качеството на влакното в сегрегиращи популации.

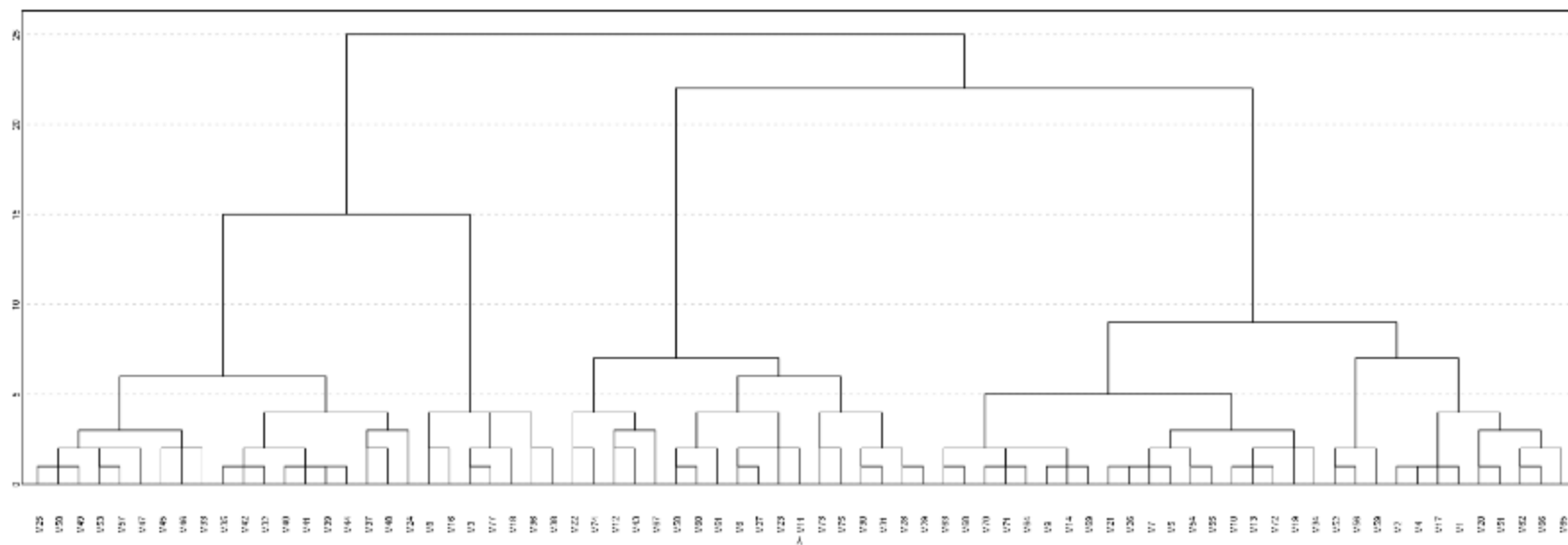
В тази първа фаза от изследването бяха включени и М1 растения от облъчени семена на изходния български генотип. Въпреки, че по отношение на фенотипните характеристики бяха наблюдавани редица изменения (частичен албинизъм, модифицирана последователност на цветообразуване, променен хабитус на растенията), растенията от М1 поколението имаха незначително по-високи нива на ДНК полиморфизъм спрямо изходните форми. Нашето допускане е, че този донякъде неочакван резултат се дължи на два основни фактора – подбора на сравнително малък брой растения за екстракция на ДНК (по 8 от всеки родителски генотип и всяка от М1 популациите) и необходимостта от провеждане на ДНК екстракциите преди да е станал известен резултатът от определяне качествата на влакното. Екстракцията на ДНК от по-голям брой растения от М1 популациите и тестирането им с по-голям брой праймерни двойки обаче не беше оправдано поради описаните по-горе причини.

Втората използвана маркерна система беше ISSR. С нейна помощ беше направена характеристика на изследваните генотипове, резултатите от което (Фигура 7) показаха, че използваният изходен материал е достатъчно хомогенен за целите на настоящото изследване. Същевременно изходният сорт Чирпан 603 може лесно да бъде отдиференциран от други образци с помощта на избраната маркерна система. На фигурата са представени резултатите от сравнителното характеризиране на два генотипа – Чирпан 603 (стартове 1-8) и 2D-18 (стартове 9-16). Както може да се види, двата генотипа са съставени от високо хомогенни групи индивиди, като същевременно двете групи са добре различими по отношение на своите ДНК профили.

При използването на тази маркерна система за характеризиране на мутантна сегрегираща популация (М6) беше постигнато добро разграничаване на индивидите само с ограничен набор праймери. В резултат от използването само на 4 праймера бяха установени общо 21 полиморфни локуса, което даде възможност за получаването на уникални профили за болшинството от индивидите. Нагледно получените резултати са представени на Фигура 8 чрез дендрограма на разпределението на индивидите по отношение на тяхното относително генетично сродство.



Фигура 7. Резултати от сравнителното изследване на два генотипа с помощта на един ISSR праймер. Стартове 1-8 – сорт Чирпан 603, стартове 9-16 – селекционна линия 2D-18.



Фигура 8. Групиране на индивидите от М6 популацията въз основа на генетичното разнообразие, установена с ISSR маркери.

Домати

CAPS маркер

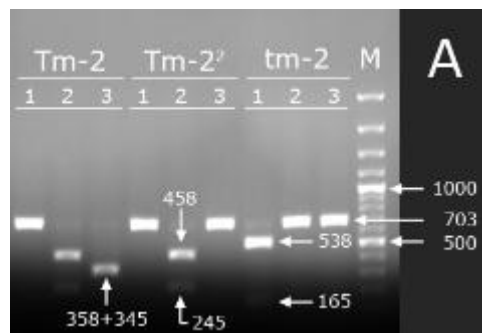
След проведен PCR с CAPS маркера от всички растения беше получен продукт, кореспондиращ по размер с очаквания от 703 bp (Shi et al., 2011). Фрагментът бе подложен на рестрикция с всяка една от ендонуклеазите – *BovI*, *KspAI*, *Alw21I*. При всички анализирани растения от линии 709, 720, 868, 1042 и едно от линия 1048 (Таблица 22) бяха получени два фрагмента (458 и 245 bp) единствено след рестрикция с ензим *KspAI*. Изходният PCR продукт от 703 bp остана интактен след третирането му с *BovI* и *Alw21I* (Фигура 10). Подобен бе рестрикционният профил на положителната контрола (линия 975) (Фигура 9). Този резултат показва, че линиите са хомозиготни по алел *Tm-22* (Таблица 23). Рестрикционният анализ на PCR продукта при всички растения от линия 981 и пет растения от линия 1048 (Таблица 22) показаха два фрагмента с размер 538 и 165 bp след рестрикция с *BovI*, и 458 и 245 bp след рестрикция с *KspAI* (Фигура 10). Получените рестрикционни профили с CAPS маркера съответстват на хетерозиготен генотип (*Tm-2²/tm-2*) (Таблица 23). Наличие на алел *Tm-2* не бе установено в нито една от изпитваните селекционни линии.

Таблица 22. Обобщена таблица на идентифицираните гени за устойчивост в шест селекционни линии домати.

Генотип	Линии					
	709	720	868	981	1042	1048
<i>tm-2/Tm-2²</i>	0	0	0	3	0	5
<i>Tm-2²/Tm-2²</i>	2	2	3	0	4	1

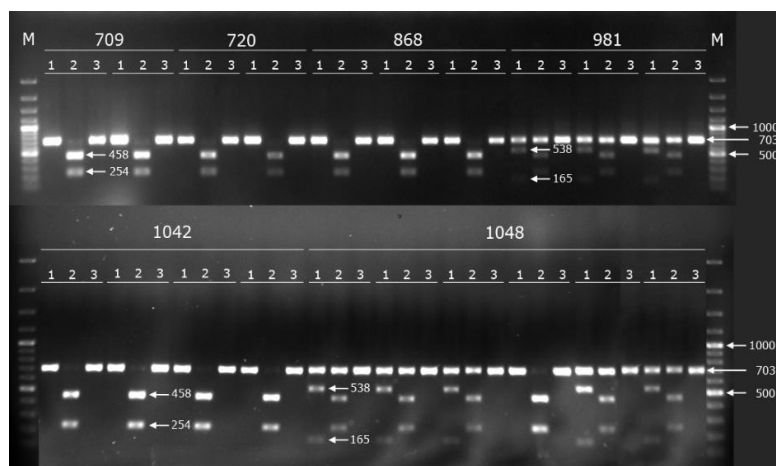
Таблица 23. Рестрикционни профили на PCR фрагмент от 703 bp с *BovI*, *KspAI* и *Alw21I* за идентифициране на алели в *Tm-2* локуса.

Алел	<i>BovI</i>	<i>KspAI</i>	<i>Alw21I</i>
<i>tm-2</i>	538 + 165 bp	703 bp	703 bp
<i>Tm-2</i>	703 bp	458 + 245 bp	358 + 345 bp
<i>Tm-2²</i>	703 bp	458 + 245 bp	703 bp



Фигура 9. Рестрикционен анализ на PCR продукт с CAPS маркер от контроли растения, хомозиготни по Tm-2, Tm-22 и tm-2. 1 – BoxI; 2 – KspAI; 3 – Alw21I; M – ДНК маркер, GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

За потвърждаване и допълване на получените от нас резултати бе проведен *in-silico* анализ на праймерите за CAPS маркера спрямо секвенциите на трите алела в локус Tm-2 (AF536199 - *tm-2*, AF536200 - *Tm-2* и AF536201 - *Tm-2*²), публикувани в базата данни на NCBI. За целта беше използван Primer BLAST (Ye et al., 2012). В резултат се установи, че полученият виртуален продукт съответства по големина на този, получен от нас (703 bp).



Фигура 10. Рестрикционен анализ на PCR продукт с CAPS маркер от устойчиви растения на селекционни линии: 709 и 720 – с по 2 раст.; 868 и 981 – с по 3 раст.; 1042 – с 4 раст.; 1048 – с 6 раст. 1-BoxI; 2-KspAI; 3- Alw21I; M – ДНК маркер, GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Впоследствие виртуалните секвенции бяха подравнени с помощта на софтуерната програма Clustal Omega (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011) и беше потвърдено наличието на рестрикционни сайтове за ензимите, посочени в Таблица 23. Между трите фрагмента има 39 разлики, като 36 от тях са само между рецесивния и доминантните алели.

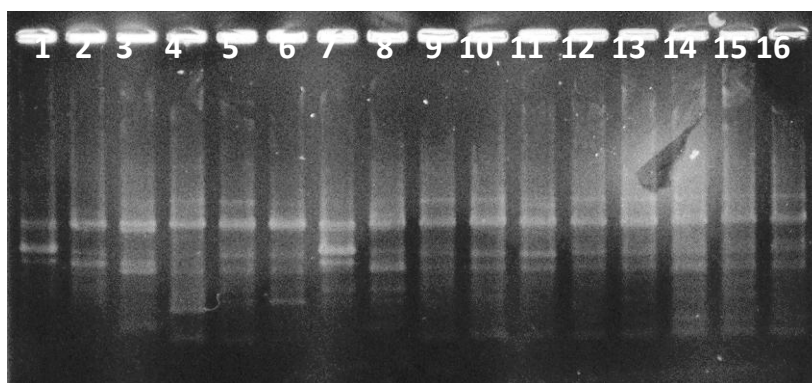
Полиморфизмът между трите последователности при 359 bp, служи за рестрикционен сайт на ензим Alw21I, използван за характеризиране на

алел *Tm-2*. Между *tm-2* и двата доминантни алела (*Tm-2* и *Tm-2*²) се открива полиморфизъм при 459 bp, който служи за рестрикционен сайт на ензим KspAI, характеризиращи доминантните алели. Рестрикционен сайт има и поради наличието на SNP в *tm-2*, който служи за характеризиране на този алел с помощта на PshAI.

ISSR маркери

Поради причини, обсъдени по-горе, нашата предпочитана система за първоначален скрининг се основава на полиморфизмите между тандемни повтарящи се последователности. ISSR маркерите са относително прости и евтини за разработване, като същевременно осигуряват мултилокусен скрининг в една реакция и добра възпроизводимост между различни лаборатории. Като първи етап, ние скринирахме отделни растения от всеки от генотиповете (Фигура 11), за да проверим капацитета на избраната маркерна система да разкрие достатъчен брой полиморфизми в рамките на вида *Solanum lycopersicum*.

Резултатите от този първоначален скрининг показаха капацитета на избраната маркерна система да диференцира генотипове в рамките на рода. Фигура 11 представя резултатите, получени с 16 от генотиповете. На нея могат да бъдат ясно идентифицирани две групи, при което групата на дивите видове е значително по-хетерогенна. Дори при този първоначален скрининг всеки от дивите видове може да бъде идентифициран по своя профил, лесно разграничим от други диви видове. Разликите



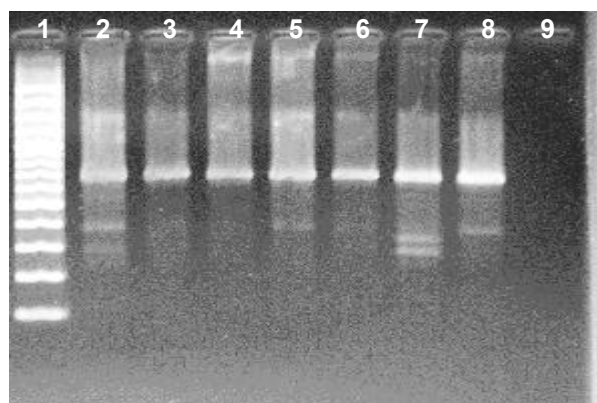
Фигура 11. Резултати от тестване на диви и култивирани видове с праймер ISSR 2. Генотиповете са подредени върху гела, както следва: 1. *Lycopersicum hirsutum* IVT 66087, 2. *Lycopersicum glandulosum* IVT 48090, 3. *Lycopersicum minutum* 911, 4. *Lycopersicum pimpinellifolium* LA 0722, 5. *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme* LA 1226, 6. *Lycopersicum parviflorum* LA 2072, 7. *Lycopersicum* f. *glabratum* LA 2864, 8. *Lycopersicum peruvianum* LA 2172, 9. cv. Трапезица, 10. cv. Бела, 11. 541/06, 12. 560/06, 13. 561/06, 14. 564/06, 15. 573/06 и 16. 618/06.

в рамките на групата от селекционни линии и сортове са много по-слабо

изразени, като някои от тях са напълно неразличими по отношение на техните профили, получени с праймер ISSR 2 (Фигура 11).

Горните резултати са получени чрез използване на геномна ДНК, извлечена от едно растение за всеки от генотиповете. За да се провери използваемостта на отделните ивици като специфични за всеки генотип, за предпочитане трябва да се използват смесени ДНК проби. Трябва да се има предвид, обаче, че използването на смесени ДНК проби прикрива нивата на присъща хетерогенност във всеки генотип и по този начин може да застраши възпроизводимостта на резултатите, ако в пробата е включен хетерогенен материал с непълна представителност. Шансовете за възникване на такава хетерогенност във всяка проба не са за пренебрегване, както се обсъжда от (Cooke et al., 2003) и (Bredemeijer et al., 2002). Без предварителни ДНК данни за генотиповете, използвани в нашето изследване, тази възможност трябваше да бъде оценена преди групиране на проби от избрани растения.

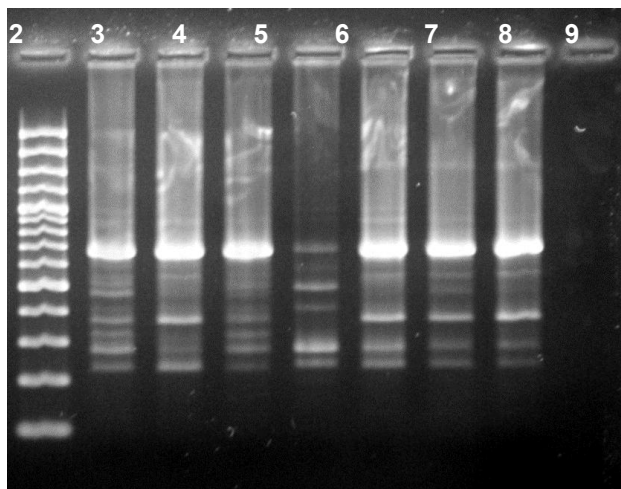
Разширяването на първоначалния скрининг в посока увеличаване броя на индивидите от генотип показаха капацитета на избраната маркерна система да диференцира дори отделни растения в рамките на образците. Фигура 12 представлява резултатите, получени със 7 растения от един от генотиповете.



Фигура 12. Разкриване на хетерогенност в продуктите, получени с праймер ISSR 2. Старт 1 – ДНК със стандартен размер с ивици от 500 и 1000 bp, изглеждащи като силни сигнали. Ивици 2-8 – продукти от PCR реакции с отделни растения от линия 216. Старт 9 – контрол.

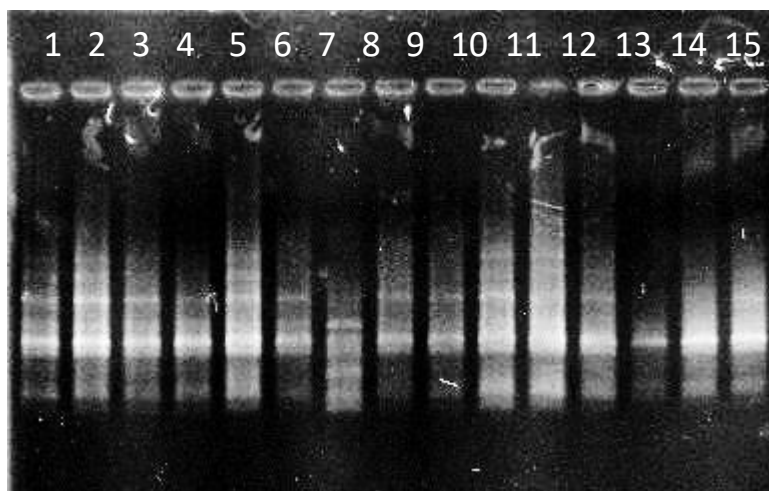
По аналогичен начин оценката на съществуващата хетерогенност във всеки от култивираните генотипове беше извършена чрез тестване на по 7 растения с всички ISSR праймери и търсене на появата на необичайни ивици (Фигура 14, Фигура 13). Интересното е, че нито един от

генотиповете не показва пълна идентичност на профилите на отделните растения (както би се очаквало от строго самоопрашващ се вид).



Фигура 13. Разкриване на хетерогенност при използване на праймер ISSR 1. Старт 1 – ДНК със стандартен размер с ивици от 500 и 1000 bp, изглеждащи като силни сигнали. Стартове 2-8 – PCR продукти от отделни растения от линия 1140. Старт 9 – контрола.

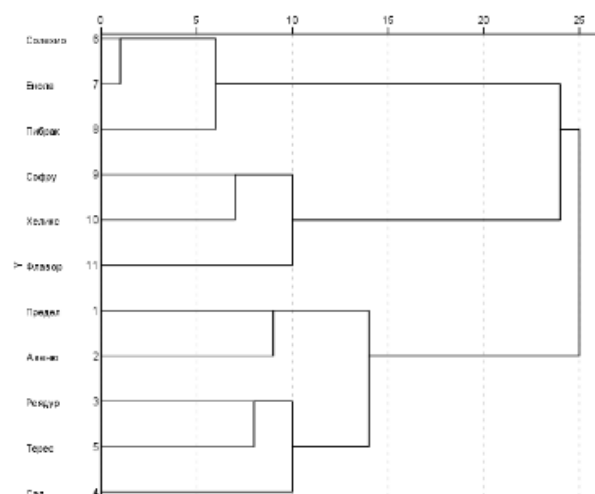
Във всички генотипове поне едно растение прояви разлики в получените профили. Както е показано на Фигура 13 растение № 4 (Старт 5) имаше ивица с размер около 380 bp, която ивица присъства във всички други растения от същия сорт. От друга страна, ивица с размер 410 bp се явява като сравнително силен сигнал в това растение, което е необичайно за други представители на същия генотип.



Фигура 14. Разкриване на хетерогенност в рамките на култивирани генотипове с праймер ISSR 7. Стартове 1-12 – PCR продукти от отделни растения от св. Трапезица. Стартове 13-15 – ДНК PCR продукти от отделни растения от св. Бела.

Пшеница

Подобно на проведените при доматиите и памука анализи, резултатите от изследването на образци пшеница демонстрираха способността на ISSR системата да разграничава образци от един и същи вид. При тази култура изследвахме 5 ISSR праймера, които продуцираха общо 55 полиморфни ивици. От тях най-малък брой (5 полиморфни ивици) продуцира праймер T11, а най-голям (11 полиморфни ивици) – праймер T14. Същевременно така получените маркери демонстрираха съществено



Фигура 15. Групиране на образците пшеница в резултат от провеждането на анализ с 5 ISSR праймера.

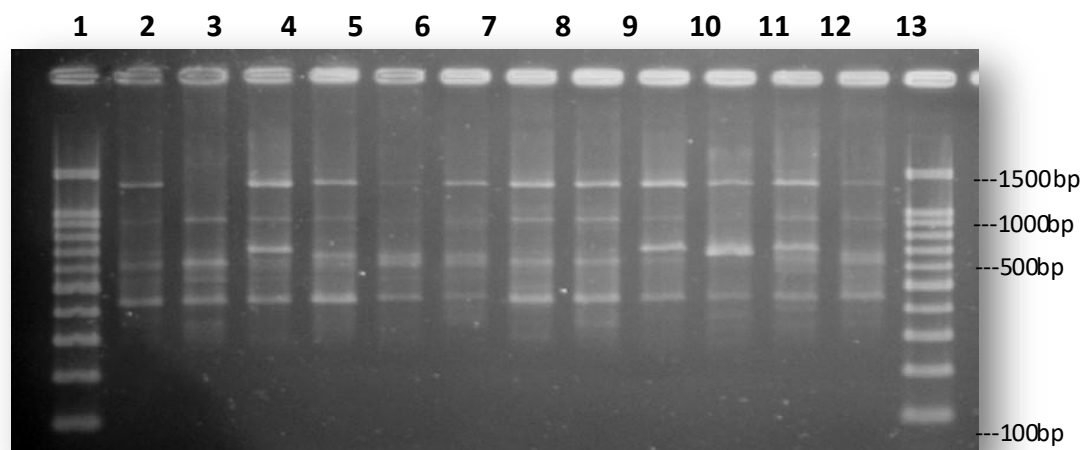
различни нива на PIC (0,165 -0,496; средно 0,335).

Разпределението на генотиповете на дендрограмата (Фигура 15) показва, че с помощта на така получените генетични профили изследваният набор от образци се разделя на три сравнително еднакви по размер клъстера. В първия са включени Солехио, Енола и Пибрак, във втория – Софру, Хеликс и Флавор, а в най-големия – Предел, Авеню, Реадур, Терес и Сая.

Ечемик

ISSR анализът, проведен при ечемик, показва общо 83 ДНК фрагмента, от които 45 (54,22 %) са полиморфни (Таблица 24). Амплификацията с праймери ISSR_4, ISSR_6, ISSR_7, ISSR_8, ISSR_5 и ISSR_6а доведе до идентифициране на редица полиморфизми между простите повтарящи се последователности. Фигура 16 ясно показва значителен брой полиморфни фрагменти.

Бяха идентифицирани общо 45 полиморфни ивици, чиито комбинации биха могли да създадат уникални модели на ивици (ДНК профили) за всеки отделен генотип (Фигура 16).



Фигура 16. Амплификация с праймер ISSR_4. Стартове: 1) Маркер, 2) I-DA/102, 3) Алексис, 4) Бета Кецорас, 5) Емон, 6) Каменица, 7) Каравела, 8) Каскадьор, 9) Обзор, 10) Неда, 11) Гораст, 12) Орфей, 13) Кифи, 14) Маркер.

Анализът на идентифицираните маркерни полиморфизми (Таблица 24) разкрива, че те варират значително. Докато маркери като ISSR_10 не показват полиморфизъм в изследваната популация, в реакциите, извършени с праймер ISSR_5 могат да бъдат идентифицирани 10 полиморфизма.

Примерът, представен на Фигура 16, демонстрира значителен брой полиморфни фрагменти, получени от извършване на PCR реакции с праймер ISSR_4. Това, заедно с други подобни резултати, получени с другите полиморфни маркери, позволи надеждното диференциране на тясно свързани генотипове на ечемик, което беше част целите от настоящото изследване.

Таблица 24. ISSR полиморфизми, разкрити с помощта на тестваните праймери.

Праймер	ДНК последователност (3'-5')	Общ брой фрагменти	Брой полиморфни фрагменти
ISSR_4	(AG) 8C+TC	11	8
ISSR_6	(AC) 8C+TG	9	5
ISSR_7	(AG) 8C+TG	13	7
ISSR_8	(AC) 8C+TT	11	6
ISSR_10	(GA) 8T	4	-
ISSR_5	RY (GACA) 3	10	10
ISSR_6a	(CT) 8+RG	9	9
ISSR_7a	(CT) 8+RC	7	-
ISSR_11	(GA) 8A	9	-
Общо:		83,00	45.00
Средно:		9.22	7.50
			Полиморфизми: 54.22%

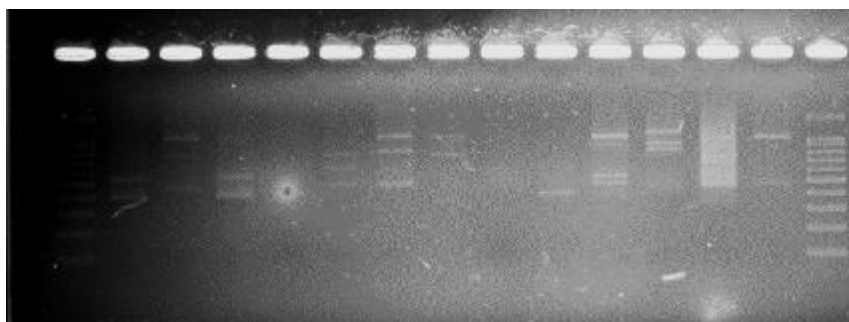
С използването на установени полиморфни маркери в последствие беше извършено групиране на изследваните генотипове, което може да се използва за повишаване ефективността на селекцията при тази култура.

Пипер

Бяха изследвани индивидуални растения от всеки образец, за да се потвърди възможността на избраната маркерна система за разкриване на достатъчен брой полиморфизми във всеки от тях. След първоначален скрининг на праймерите, бе установено, че някои от тях не водят до получаването на амплифицирани фрагменти. Това най-вероятно се дължи на липса или малък брой на съответната микросателитна последователност, оградена със съответните селективни нуклеотиди, в генома на изпитваните образци.

Провеждането на реакциите с избраните праймери доведе до получаването на един или повече полиморфни фрагменти на образец. При някои образци се получиха по-малко полиморфни ивици, които не бяха достатъчни за идентификацията на всяко растение от съответния образец с помощта само на един праймер (Фигура 17). Получаването на такива резултати можеше да се очаква поради ниските нива на генетично разнообразие при самоопрашващо се растение като пипера.

Установяването дали отделните фрагменти са специфични за всеки генотип (образец), предполага използване на сборни проби. От друга страна, използването на сборни проби би скрило нивото на хетерогенност в генотиповете, което би понижило възпроизводимостта на резултатите, ако пробата съдържа хетерогенна група индивиди. Тъй като вероятността за такава хетерогенност във всеки генотип не е пренебрежима, както показват изследванията на (Cooke et al., 2003) и (Bredemeijer et al., 2002), а и нямашме предварителна информация за генотиповете, които подложихме на анализ в това изследване, прибегнахме до сравнението между профилите само на индивидуални растения от всеки образец.

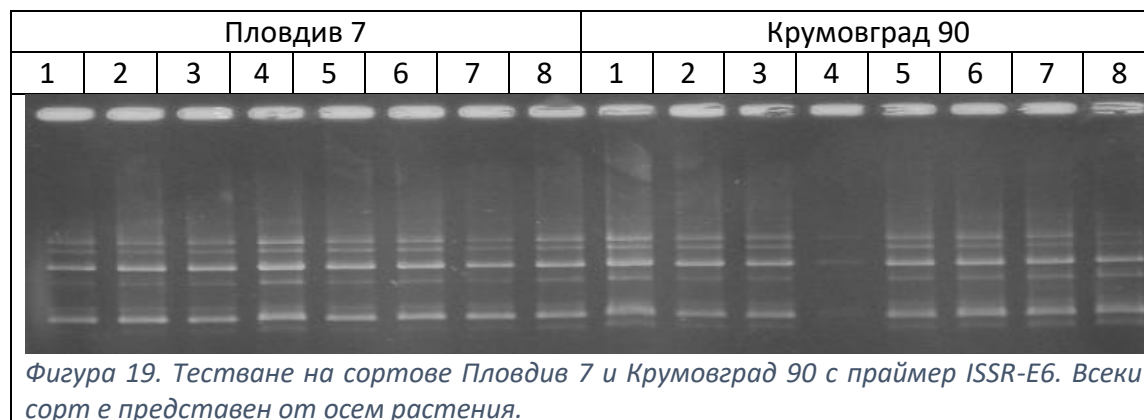
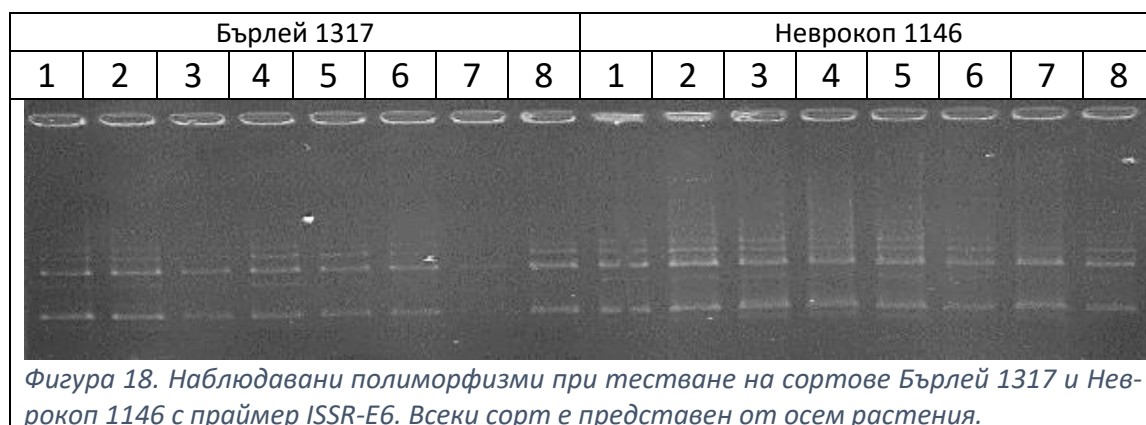


Фигура 17. Резултати от провеждането на ISSR реакции с праймер E8 при тринадесетте образци, използвани в изследването.

Тютюн

Скринингът на 4 ISSR праймера разкрива променлив брой ивици, генерирани от различни праймери. Общият брой ивици варира между 13 за ISSR-E7 и 4 за праймера ISSR-E2. По подобен начин, броят на полиморфните ивици също беше променлив. Не се наблюдава корелация между общия брой ивици и броя на полиморфните ивици.

Допълнителни тестове разкриха, че растения с различни ДНК профили могат да бъдат намерени в рамките на отделните сортове. Още по-интересното е, че използването на праймер Е6 разкрива полиморфизми в сорта Бърлей 1317 (което показва, че две от растенията се различават от останалите), като същевременно произвежда по същество идентични профили за четирите сорта (Фигура 18 и Фигура 19). Силно сходните профили за тези два сорта от различни производствени видове, получени при използване на праймер Е6 показват, че техниката на „пръстовите отпечатащи“ на ДНК може да представлява особено предизвикателство при тази култура.

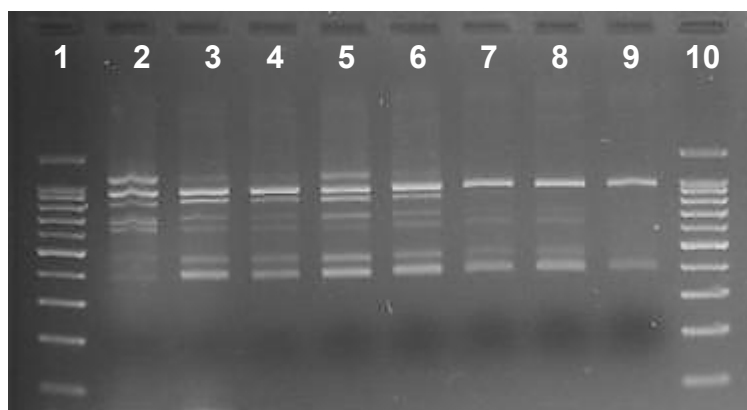


Царевица

Проведените изследвания на подбраната група хибриди с набор от ISSR маркери показва, че и при тази култура системата позволява ефективно

разграничаване на отделните генотипове. Използването на този тип маркери позволява лесно да се разграничат отделните хибриди само с малък набор (1-2) реакции. Нещо повече, в резултат на използването на някои от праймерите бяха установени растения с различаващи се профили в рамките на отделни хибриди.

И макар като цяло хибридите царевица да показваха високи нива на хомогенност (с редки изключения на единични отклоняващи се растения), при един от тях беше установено особено съществено разнообразие сред групата от 7 изследвани индивида (Фигура 20).



Фигура 18. Установено генетично разнообразие в рамките на най-хетерогенния хибрид царевица. Стартове 1 и 10 – ДНК стандарт. Стартове 3-9 – ДНК профили на 7 растения от един хибрид. Старт 2 – растение от друг хибрид (положителна контрола).

Phytophthora

В резултат от изпитването на всички 10 праймера беше установено, че праймери E6, E7 и E10 не успяха да продуцират полиморфни фрагменти при провеждането на реакции с изследваните 22 изолата от *Phytophthora* sp. След провеждането на PCR реакции с тези праймери гел-електрофорезата не показва задоволителни визуални резултати и по тази причина те не могат да бъдат коментирани.

При анализа на електрофоретичните данни от използването на праймер E2 беше установено, че стартове 1 и 2, които са с еднакъв генотип, дават различни профили. Това различие може да се обясни с недоброто сработване на праймера при използването на ДНК от f2 генотип. Имайки предвид горната информация отбелязахме приликата между f1 и f4 (с общи бендове 200 bp, 300 bp, 400 bp, 900 bp и 1100 bp). Тази еднаквост е не беше очаквана, тъй като двата изолата са направени от патогени, открити в съвсем различни гостоприемници. Общото между тях е региона. Нетипични сходства бяха установени и между стартове 6 и 8, в които

се съдържат геноми на *Phytophthora*, паразитиращи по различни гостоприемници.

Сходни резултати бяха получени и с останалите праймери, които за краткост тук няма да коментираме.

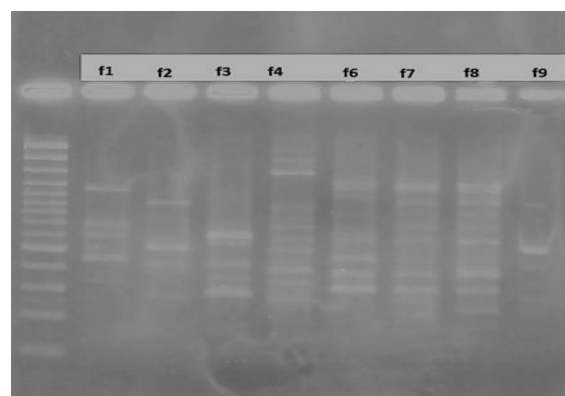
Fusarium

Резултатите от първоначалното скриниране на използвания набор от праймери демонстрираха потенциала на избраната ISSR маркерна система да диференцира генотиповете в рамките на рода.

При изследването на генотиповете с праймер E2 (Фигура 21) беше установено, че наблюдаваното при използването на предходния праймер сходство между стартове 2, 3, 4 и 6 не се наблюдава при реакцията с използване на праймер E2. Провеждането на реакция с този праймер показва, че стартовете 6, 7 и 8 имат идентично разпределение на фрагментите с три ясно различни бенда на 900bp, 1100bp и 1200bp.

Въпреки, че при тестването на изучаваните щамове *Fusarium* с праймер E3 се получи между 5 и 12 ясно различни фрагмента, използването на този праймер не беше в състояние да продуцира уникален профил за всеки един от изследваните генотипове.

Използването на праймер E3 показва, че стартовете 7 и 9 имат идентично разпределение на фрагментите с четири ясно различни бенда на 300bp, 500bp, 1000bp, и 1200bp. От друга страна предварителните данни за произхода на тези изолати беше, че двата старта не съдържат еднакъв материал.



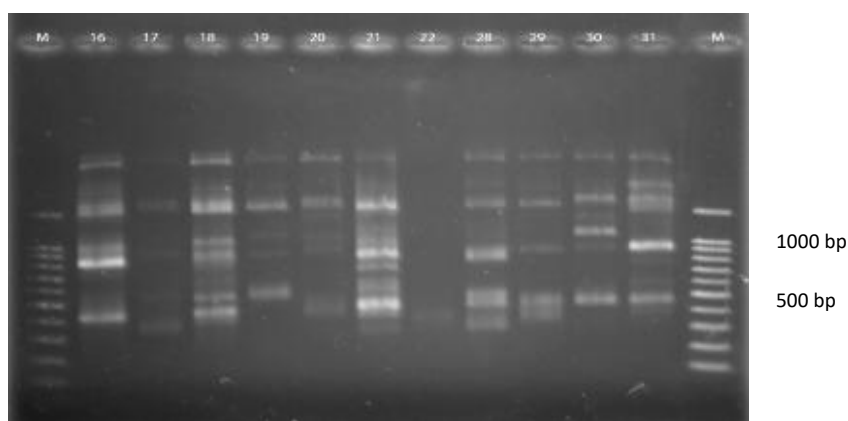
Фигура 19. Резултати от тестването на изучаваните щамове *Fusarium* с праймер E2.

Кози

Първоначалният скрининг с предварително избрани ISSR маркери (Фигура 22) имаше за цел да провери капацитета на избраната маркерна система да разкрие достатъчни нива на полиморфизъм в рамките на двете породи. Както е показано на фигурата, използването на избраните

ISSR праймери произведе редица полиморфни ивици между отделните животни. Поради това те бяха използвани за скрининг на двете популации, в опит да се разкрие генетичното разнообразие както вътре, така и между двете местни породи кози.

Както се очакваше, използването на различни ISSR праймери доведе до разкриване на различен брой полиморфни ивици в двете породи. В резултат на скрининг на няколко праймера и оптимизиране на PCR условията бяха идентифицирани 2 ISSR праймера, които произвеждат информативни полиморфизми в тези местни породи.



Фигура 20. Полиморфизми при Калоферска дългокосместа порода, разкрити с праймер E7. Линия М – 1kb ДНК стандарт. Номерирани стартове – PCR продукти от различни животни.

Използване на доминантните маркери за картиране на QTL

Сложният характер на наследяването и изискването за комбиниране на няколко различни (и често отрицателно корелирани) признака прави отглеждането на сортове с добри технологични показатели, носещи множество подобрени характеристики на влакното, трудна задача, която всеки селекционер на памук се стреми да разреши. Подпомаганата от маркер селекция (MAS) е предпочитан инструмент през последните години, тъй като значително улеснява подбора на генотипове за кръстосване във всяко поколение. Тъй като се идентифицират и молекулярно маркират все повече и повече алели, имащи положителен ефект върху интересните характеристики, селекционерите ползват в своите реални програми този инструментариум като все по-достъпен.

Една от основните стъпки при идентифицирането на подходящи маркери за използване в MAS е свързването на маркери с характеристиките, представляващи интерес. В настоящото изследване бяха идентифицирани няколко такива маркера. Освен това картирането им в генетична

карта предостави допълнителна представа за това какво всъщност би могло да доведе до модификация на интересуващите ни признаци. За анализ на молекулярни маркери, свързани с качествени и количествени признаци, некартирани при разработването на унифицираната карта, бяха скринирани общо 3 двойки SSR и 13 ISSR праймера за способността им да разкриват полиморфизми.

Таблица 25. Групи на свързване на ISSR маркери.

Свързващи групи от всички локуси													
Група	Брой локуси	ISSR маркер №											
Без връзка:	11	2	6	7	9	22	24	25	26	31	33	34	
група 1:	12	1	4	5	10	14	16	17	20	21	27	30	32
група 2:	10	3	8	13	15	18	19	23	28	29	35		
група 3:	2	11	12										

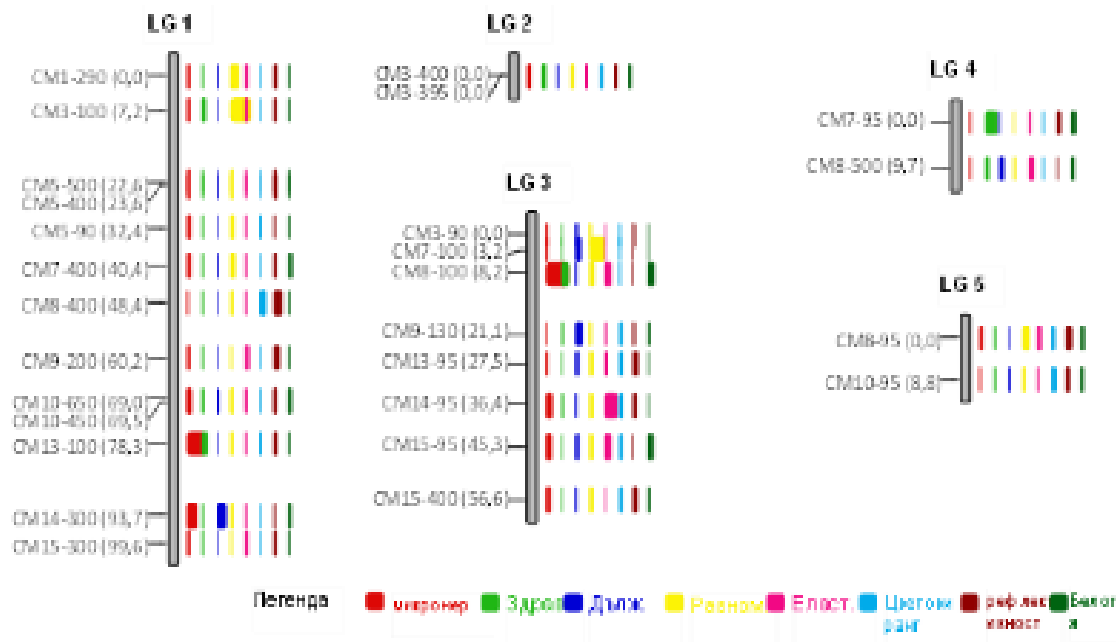
* LOD min: 3,00; r max: 0,10; cM max: 10,1

ISSR праймерите успяха да произведат голям брой маркери. Скринингът на популацията с 13-те праймера доведе до големи разлики в производството на полиморфни ивици, където 3 от тях не доведоха до разкриване на полиморфизми, докато останалите 10 дадоха между 2 и 8 полиморфни ивици. Като цяло ISSR праймерите произвеждат 41 полиморфни ивици в популация от 126 индивида. От тях само 35 могат да бъдат картирани, тъй като някои са имали само една поява в изследваната популация (Таблица 25).

От 27-те полиморфни ивици, идентифицирани в настоящото изследване, само една (означена като CM14-300) има значителен ефект върху дължината на влакното. Този локус беше асоцииран с LG1 и имаше статистически значим ефект, обяснявайки 6,6% от общата вариране на признака. Здравината на влакното е значително повлияна от два различни локуса – единият (CM8-100) на LG3, обясняващ 4,7% от вариабилността на признака, а другият – на LG4 (CM7-95), обясняващ 7,7%. Равномерността, от друга страна, беше повлияна от два различни региона – единият включваше маркери CM1-290 и CM3-100 (обхващащ 7,2 cM на LG1 и обясняващ 18% от общото вариране), докато в другият беше установен един маркер (CM7-100), отговорен за 9,8% от варирането и разположен върху LG3. Еластичността е повлияна от един регион на LG3, който обяснява 14,3% от варирането на признака. Регионът включва маркери CM13-95, CM14-95 и CM15-95 и обхваща 17.8 cM от тази група на свързване.

Въпреки предоставянето на известна представа за ефектите на различни локуси върху изследваните характеристики на влакното, асоциативното

картиране за единични признаци не може да предостави доказателства, които да подкрепят корелацията (независимо дали е положителна или отрицателна) между различните признаци, която се наблюдава в много класически селекционни проучвания. Комбиниране на картите за всички характеристики (Фигура 23) предостави такива доказателства, като по този начин подкрепи поне някои от добре известните преди това корелации. В нашето изследване горната част на LG3 съдържа област, обхващаща 5 cM (дефинирана от маркери CM7-100 и CM8-100), която има статистически значим ефект върху здравината на влакното, микронера и еластичността. Това откритие е в съответствие с наблюденията, че микронерът като мярка както за фиността, така и за зрелостта на влакното се влияе от натрупването на целулозни фибрили (което подобрява здравината, но намалява еластичността). Следователно, мутагенното третиране, приложено в началото на настоящото изследване, може да е повлияло на някои основни процеси на натрупване на целулоза, които се определят от локуса/локусите, маркирани с гореспоменатите маркери. Необходими са допълнителни проучвания, за да се установи кои от многото възможни механизми (свързани или със синтеза на целулоза, или с отлагането ѝ) са засегнати, но едновременната модификация на трите признака силно подкрепя тази хипотеза.



Фигура 21. Комбинирана генетична карта за всички изследвани признаци в мутантната сегрегираща популация. Ширината на цветните ленти представлява процента на вариране на признака, обяснен с присъствието на маркер в съответния локус.

Дискусия

SSR маркери

Всичко гореизложено показва че приложимостта на микросателитните маркери може да се търси основно в посока използването им за селекционни цели. Очевидно този тип маркери са най-добре приложими в контекста на конкретните популации, за които са разработени. Това означава, че прехвърляемостта между популации, разработени на съществено различна генетична основа би била твърде ниска и, съответно, използването им трябва да се ограничи най-вече до конкретния контекст на селекционната програма, за която са били първоначално разработени.

Използването на микросателитните маркери в селекционните програми води до ускорена селекция на специфични алели, без обаче да се проследява паралелно ефектът на този селекционен натиск върху други алели. Това означава, че в такива случаи може да се очаква отсъствие на селекционен натиск върху алели, които са били идентифицирани като имащи ефект в различен генетичен контекст. Очакваното в такива случаи връщане към нормалното разпределение на тези алели може да ги направи по-добре приложими за целите на РХС тестирането. За целта трябва да се извърши допълнителна проверка на нормалността на разпределението им (която по определение включва и проверка за елиминиране на някои от алелите, т.е. за такива, преминали в мономорфно състояние).

CAPS маркери

Употребата на молекулярни маркери за генотипиране на Tm-2 локуса при домати започва още в началото на 90-те години на миналия век, след като същият е картиран от (Tanksley et al., 1992). На базата на тази информация редица автори описват молекулярни маркери, свързани с локуса, но въпреки положителните резултати, получени от тях, при анализ на друга генплазма е установено, че приложението на повечето от тях е неуспешно (Panthee et al., 2013). Според същите автори това може да е вследствие от разположението на маркерите в района около Tm-2 локуса, като при евентуална рекомбинация връзката между гена и маркера може да бъде загубена.

Поради това за целите на нашето изследване бяха избрани маркери, изготвени спрямо Tm-2 локуса от (Shi et al., 2011) на база секвенции с номера AF536199, AF536200 и AF536201, публикувани в NCBI от (Lanfermeijer et al., 2003). Резултатите, получени от приложението на CAPS маркера за идентифициране на Tm-2 и Tm-22 алелите съответстват на тези, посочени от (Shi et al., 2011). Тези резултати бяха потвърдени и

от *in-silico* анализ на фрагмента, заключен между праймерите за CAPS маркера, т.е. потвърдени бяха местата на рестрикционните сайтове на използваните ендонуклеази. Получените продукти след рестрикцията бяха отчетливи и определянето на генотипа на растенията беше лесно, което е важно за рутинното приложение на маркера (Фигура 9 и Фигура 10). Резултатите показаха съответствие и с проведените биологичен и серологичен тестове, което се очаква вземайки под внимание факта, че амплифицираният фрагмент се намира в самите гени за устойчивост. Въпреки това считаме практическата приложимост на този тип маркери за сравнително ограничена поради изискването за провеждане последователно на PCR и рестрикционни реакции. Това едновременно повишава изискванията към квалификацията на персонала и усложнява и оскъпява провеждането на анализите.

ISSR маркери

Памук

Приложението на ISSR маркерната система при разпадаща се мутантна популация (М6) показва, че тя е в състояние да идентифицира достатъчен набор от различия дори в такава група от близкородствени индивиди (Фигура 8). При използването на тази маркерна система за характеризиране на мутантна сегрегираща популация (М6) беше постигнато добро разграничаване на индивидите само с ограничен набор праймери. Както беше посочено по-горе, в резултат от използването само на 4 праймера бяха установени общо 21 полиморфни локуса, което даде възможност за получаването на уникални профили за болшинството от индивидите. Имайки предвид, че изследваните образци са със силно близкородствен произход (индуциран мутагенезис в чистотинен сорт, чиято хомогенност беше проверена преди подлагането му на мутагенно въздействие), считаме че представените тук резултати дават нагледен пример за високата ефективност на ISSR ДНК профилирането за целите на селекцията. От друга страна, в рамките на настоящото изследване демонстрирахме и потенциала за използването на ISSR маркерната система за диференцирането на сортове и селекционни линии (Фигура 7), което би било полезно при РХС тестирането. Както беше показано, системата позволява едновременното разграничаване на сорт и линия, заедно с проверката за хомогенност на индивидите от двата генотипа.

Домати

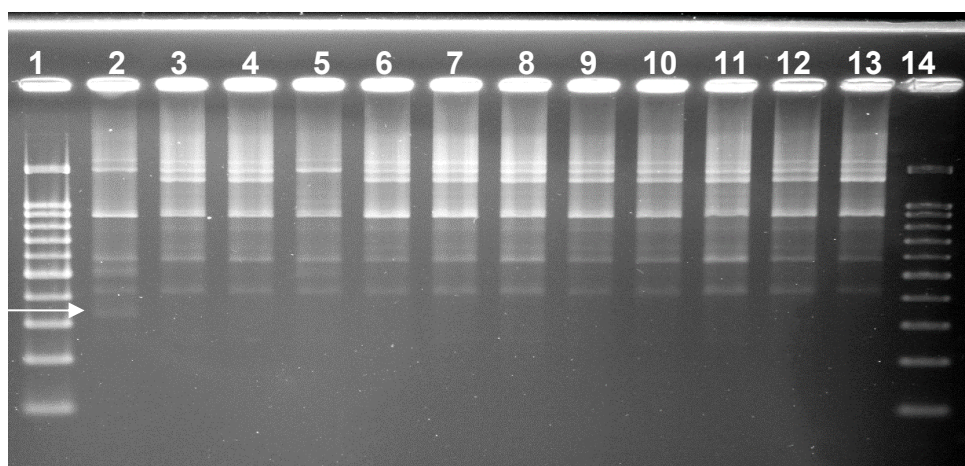
При анализа на сортове и линии домати бяха наблюдавани разлики в получаваните ДНК профили между растенията, които принадлежат към

един сорт/линия и които изглеждат идентични по отношение на своите фенотипни характеристики. Едно възможно обяснение на наблюдаваното несъответствие между фенотипната хомогенност и идентифицираната генотипна хетерогенност е, че хетерозиготните локуси не са свързани с признаците, по отношение на които са подбирани генотиповете по време на селекционния процес. От друга страна, (Bredemeijer et al., 2002) предполагат, че такива резултати могат да се обяснят с наличието на остатъчна хетерогенност главно в некодиращите последователности и/или в локусите за количествени признаци (QTL) с много малък фенотипен ефект. Елиминирането на такава остатъчна хетерогенност би било невъзможно с класическите селекционни подходи. Под въпрос е дали опитът да се елиминира такава хетерогенност с помощта на молекулярни маркери е от някаква практическа полза. Това се дължи не толкова на липсата на фенотипни ефекти от нея, тъй като тези полиморфизми могат да са свързани с други характеристики, неотчетени към момента в селекционната програма. Основен критерий за практическа приложимост на усилията за елиминиране на такава остатъчна хетерогенност следва да бъде проверката дали тя има съществен ефект върху други признаци – било биохимичен състав на растенията или отделни техни части, било ефекти върху архитектурата или други свойства на културата, които биха могли да представляват практически интерес от гледна точка на технологията на отглеждане.

Демонстрираният капацитет на ISSR да идентифицират наличието на такава хетерогенност в изследваните растителни материали предоставя поразително доказателство в подкрепа на внимателния подбор на маркерната система. Една маркерна система, която има смисъл да бъде въведена в селекционните програми и официалното РХС тестване, трябва да бъде надеждна, ефективна, бърза и лесна за прилагане. В случаите, когато едно растение се отклонява от групата от 7 от същия генотип, премахването на това растение може лесно да доведе до елиминиране на хетерогенността от избора генотип. Въпреки това в случаите, когато повече от едно растение се появява с различен профил, изборът на представителния набор от ивици за конкретен генотип може да бъде труден, особено когато растенията изглеждат разделени на две повече или по-малко равни групи. В такива случаи възниква въпросът какво трябва да се счита за „значително отклонение“ и дали може да се създаде представителен профил за този конкретен генотип, така че да може да бъде разграничен от други генотипове при РХС тестване.

Един допълнителен аспект, който демонстрираният капацитет на ISSR маркерите да идентифицират наличието на такава хетерогенност в

изследвания материал представя, е възможността правилно подбраната маркерна система да служи едновременно за целите на РХС тестирането и за нуждите на селекционния процес. Както вече беше коментирано, изискванията към съответните маркерни системи в двете направления са съществено различни (UPOV, 2021). По-горе демон-стрирахме, че избраната от нас ISSR маркерна система може да бъде въведена в селекционните програми защото е надеждна, ефективна, бърза и лесна за прилагане. Така например, прилагането на ISSR в нашето проучване демонстрира приложимост за повишаване ефективността на селекционния процес при подбора на родители и F1 индивиди. В случая с домати, използването на ISSR маркерна система доведе до идентифициране на F1 растение № 3 (Фигура 24, старт 5) като нехибриден индивид. Заключение, че това е по-скоро индивид, произхождащ от самоопрашване на родителя P1, се основава на присъствието в неговия профил на ивица от 510 bp, която присъства в родителя P1 и не присъства в родителя P2. Освен това, на същия индивид липсват ивиците от 590, 800 и 1350 bp, които присъстват в P2, а не в P1. Нашите резултати показаха, че ДНК профилирането на F1 хибридните растения, което позволява идентифициране на нехибридни индивиди и потвърждаването на хибридната природа на другите индивиди, може да бъде постигнато с използването на един ISSR праймер (ISSR 3 в случая, представен на Фигура 24).



Фигура 22. Резултати от тестване на родители и F1 хибридни растения домати с праймер ISSR 3. Генотиповете са подредени върху гела, както следва: Старт 2 – Родител 1 (PK), Ивици 3-12 – F1 хибридни растения. Старт 13 – Родител 2 (L 1116). Стартове 1 и 14 – ДНК със стандартен размер. Стрелките показват ивици, които са полиморфни между родителите.

Маркерната система ISSR е много подходяща за използване в селекционни програми, тъй като изисква малко количество първоначална геномна ДНК, използва прост протокол за приложение и дава надеждни

резултати (Penner et al., 1993; Rajput et al., 2006). Резултатите от нашето проучване показаха капацитета на избраната маркерна система да диференцира не само родителските линии, но и някои от отделните растения в рамките на родителските линии. Освен това, прилагането на системата ISSR позволи идентифицирането на отклоняващи се растения от F1 хибридна популация, което отклонение по-късно беше потвърдено фенотипно.

Ечемик

Комбинирането на данните от различните видове анализи успя да предостави значително по-пълна и по-точна картина на генетичното разстояние между изследваните генотипове. Това от своя страна има потенциала значително да улесни подбора на родителски форми от тази работна колекция за бъдещи селекционни програми.

Тютюн

Като първа стъпка към практическото приложение на тази техника при българските тютюни тук представихме изследване на вътрешно- и междусортовото разнообразие при местни форми, с акцент върху практическата приложимост.

При разработването на техника за ДНК „пръстови отпечатьци“ в изследване на генетичното разнообразие едно съображение, което трябва да се вземе предвид, е определянето на нивата на полиморфизъм в рамките на сорта като наблюдаваното в настоящото изследване.

Това е важно не само за надеждността на идентификацията на сорта, но и за определянето на значимостта на разликите по отношение на различимостта (приписване на изследвания генотип към съществуващ сорт или придаване на статус на нов). Разширено експериментиране трябва да бъде извършено от всеки орган за тестване на сортове преди пълното приемане на ДНК „пръстовите отпечатьци“ като стандартен метод за използване. Ако се приеме, че (по практически причини) не повече от 4 двойки ISSR праймери ще бъдат използвани при такова тестване за различимост и хомогенност, това ще позволи поддържане на ниски разходи за определяне на полиморфизма в рамките на предлагания нов образец във всеки държавен орган. Надеждността и възпроизводимостта на микросателитните маркери (SSR) и полиморфизмите на дължината на амплифицираните фрагменти (AFLP) правят тези две маркерни системи предпочитани при много различни растителни видове (Chen et al., 2015; Chen et al., 2000; Faccioli et al., 1999; Garg et al., 2001). Нашето предишно сравнително проучване за потенциала на SSR и AFLP за получаването на

ДНК „пръстови отпечатьци“ от памук (Bojinov and Lacape, 2003) очерта съответните предимства на тези два вида маркери в зависимост от размера на популацията, нейното разнообразие и наличието на необходимо оборудване и лицензи. Както беше представено в настоящото изследване, понастоящем AFLP биха били избраната техника, когато трябва да се вземат ДНК „пръстови отпечатьци“ от големи популации. Във всички останали случаи, обаче, нашето изследване показва, че препоръчителната система за използване е ISSR.

Нашите данни показват, че ограничен набор от ISSR маркери би бил достатъчен за идентификация на сортовете и адекватното групиране на линии и сортове тютюн според целта на съответното изследване. Освен това, в бъдеще анализът на допълнителни линии на тютюн с помощта на разширен набор от ISSR маркери ще бъде в състояние да предостави много по-подробна картина на генетичната свързаност на линиите тютюн в рамките на и между отделните групи зародишна плазма, използвана в българските селекционни програми.

Пшеница

При тази култура изследвахме 5 ISSR праймера, които продуцираха общо 55 полиморфни ивици. От тях най-малък брой (5 полиморфни ивици) продуцира праймер T11, а най-голям (11 полиморфни ивици) – праймер T14. Същевременно така получените маркери демонстрираха съществено различни нива на PIC (0,165-0,496; средно 0,335). Както беше коментирано в раздела Материал и методи, ниските стойности на PIC се получават в случаите, когато имаме само единична присъстваща/отсъстваща ивица в профила на някой от индивидите от изследваната популация. Такива ивици могат да са високо информативни по отношение на специфични генетични детерминанти и по този начин да са полезни за диференцирането на генотипа от останалите в групата. Такива маркери обикновено представляват специфичен селекционен интерес, поради което са с основно направление на използване в тази насока. От друга страна маркерите с висок PIC (високо полиморфните маркери в изследваната популация) са от полза при ДНК профилирането на генотиповете за нуждите на РХС изпитването.

Царевица

Използването на ISSR маркерната система позволи диференцирането на набора от царевични хибриди, използван в нашето изследване. Използването само на един праймер е в състояние да доведе до идентифицирането на значителен брой полиморфизми, което е необходимо условие

за повишаване ефективността на системата. Въпреки ограничения брой праймери, които бяха изпитани, успешното получаване на уникални профили за редица хибриди, както и демонстрираната способност на системата да идентифицира отклоняващи се индивиди в рамките на хибридите показват нейната приложимост за нуждите на РХС тестирането. В случая с тази култура не бяха проведени изследвания за асоцииране на ISSR маркерите с качествени и/или количествени признаци, тъй като в АУ отсъства необходимия капацитет като лабораторно оборудване и технологичен комплекс за фенотипиране.

Пипер

До настоящото проучване няма демонстрирано приложение на MAS инструменти с практическа приложимост за българските селекционни програми, тъй като разработените извън страната са базирани на чужда зародишна плазма, а проучванията в страната са в начален стадий. Единственото известно проучване (Tsonev et al., 2017) цели да се групират 19 сорта пипер (*Capsicum annuum* L.) от колекцията на Института по зеленчукови култури Марица, Пловдив, България в клъстери според техните относителни генетични разстояния, оценени по технологически признаци и 9 ди- и три-нуклеотидни ISSR маркери и да се оцени връзката между тях. Въпреки, че това представлява изключително важна първа стъпка при подбора на родителски форми за хибридизация, няма налични данни изследването да е продължено с анализ на F1 хибриди и/или разпадащи популации от инициирани кръстоски.

Проведеното от нас генотипното профилиране на серия от образци с помощта на двата ISSR праймера (E5 и E8) беше използвано за клъстерирането им според тяхната относителна генетична отдалеченост.

Единственото известно ни изследване на български образци пипер (Tsonev et al., 2017) установява, че с използваните от тях 7 ISSR праймера не успяват да получат уникални профили за всеки един образец от колекцията от 19 сорта. Нещо повече, една цяла група от 5 образци се оказват напълно неотличими. Всичко това демонстрира важността на правилния подбор на ISSR праймери за ДНК профилирането на българската генплазма при тази култура.

Phytophthora

В резултат от направения анализ беше идентифициран набор от праймери, основани на ISSR маркерна система и имащи потенциала да установят наличието на достатъчно информативни полиморфизми между изпитваните генотипове *Phytophthora* sp. Най-интересна резултати бяха

получени при използването на праймер E2, където бяха идентифицирани най-голям брой полиморфизми в генотиповете в рамките на рода. Провеждането на PCR реакция с използването на останалите праймери успя да доведе до идентифицирането на достатъчни нива на полиморфизъм.

Полиморфизми, освен в генотиповете от различните фенотипни групи, бяха идентифицирани и в патогени със сходен или еднакъв фенотип. Такъв е примерът с праймер E2, при който бяха наблюдавани най-нетипичните профили. Нашите резултати показаха, че фенотипно еднакви генотипове даваха нетипични и различни профили (f1- f2 и f15-f16), а други, които са фенотипно различни, бяха групирани като идентични (f1 - f4; f6 – f8; f9 – f10 и f20 – f21 – f22.) В последващи проучвания би било интересно установяването на причините за тези проявления.

Представените резултати показват, че с използването на ISSR маркери може да се разработи система за идентифицирането на генотипове от р. *Phytophthora*. Това демонстрира потенциала на предлагания метод за разкриване на разлики дори и в рамките на едни и същи фенотипни групи и анализирането на генетичното разнообразие в този фитопатогенен род.

Fusarium

Като обобщение от получените в настоящата разработка резултати можем да отбележим, че използването на ISSR маркерна система за идентифицирането на генотиповете *Fusarium* може да стане с използването на най-малко 2 праймера. Двойките праймери, които са в състояние да продуцират уникални профили за всички изследвани генотипове са праймер E1 и праймер E3, праймер E2 и праймер E3, праймер E3 и праймер E4, праймер E3 и праймер E6.

Наличието на такъв голям брой комбинации показва, че избраната система има достатъчно голям потенциал за идентифицирането на значителен брой полиморфизми, за да може търсенето на нови праймери, с които да се постигне идентификацията на всички генотипове с една реакция, да бъде обосновано.

Кози

Първоначалният скрининг с два ISSR праймера успя да демонстрира капацитета на избраната система за идентифициране на информативни полиморфизми при двете породи дългокосмести кози. При използването само на два ISSR праймера диференцирането на индивидите от двете породи е непълно като и при двете породи това е илюстрирано с

наличието на групи от практически генетично неотличими индивиди. Макар и очаквани при такива породи със сравнително скорошен произход, тези резултати не отговаряха на изискването за адекватното диференциране на всяко от изследваните животни.

След предварителен скрининг на още няколко ISSR праймера за продуцираните нива на полиморфизъм общо в рамките изследването бяха включени 4 ISSR праймера, което бе достатъчно за получаването на групиране на индивидите, което добре съответства на тяхното предполагаемо сродство. Използването на набор от 4 ISSR праймера доведе до получаването на напълно задоволителни резултати по отношение групирането на индивидите. Така приложението на ISSR маркерната система демонстрира необходимия потенциал за разкриването на полиморфизми, продуциращи информативни ивици, с чиято помощ да се постигне задоволително диференциране на животните по степента на тяхното родство. Това е една важна стъпка към разработването на ефективна система за генотипиране на животните от двете породи за да се разширят и допълнят познанията ни за степента на тяхното родство и диференциация.

Приложимост на ISSR маркерите при PXC тестирането

С представените в настоящото изследване примери, основани на организми от различни групи (растителни и животински), считаме за обосновано предложението за използването на ISSR маркерната система като стандартна при PXC изпитването в нашата страна. Детайлно бяха представени примери и анализи за съответствието на системата на набора от изисквания на UPOV към приложението ѝ (UPOV, 2021). По-долу ще коментираме съответствието на конкретните демонстрирани параметри на системата на набора от критерии на UPOV.

Съгласно документа на UPOV, важни съображения за избор на методи за профилиране на ДНК, които генерират висококачествена молекулярни данни са:

1. *Възпроизводимост на получаването на данни в и между лаборатории и платформи за откриване (различни видове оборудване).*

Както показахме с представените литературни данни и с нашите данни и анализи, получаването на данни за ISSR профилиране на образците не зависи от използваната апаратура. Използваните от нас 3 различни вида PCR апарати (2 градиентни и 1 обикновен) бяха многократно сравнително тествани, при което демонстрираха висока възпроизводимост на резултатите между повторенията. Същевременно, редица изследователи демонстрират и тяхната висока възпроизводимост между различните лаборатории, с което този първи критерий е напълно удовлетворен.

2. Повторяемост във времето.

Представените в този труд изследвания са провеждани в продължение на повече от 15 години, при което сравнимостта на получаваните профили е потвърждавана чрез периодичното използване на референтни ДНК проби, изолирани назад във времето. Основно този вид верификация е извършвана с образците от памук и домати, но е налице и достатъчно информация за ечемика, пшеницата и тютюна.

3. Дискриминационен капацитет

В рамките на настоящото изследване бяха представени редица примери за високия (при необходимост) дискриминационен капацитет на ISSR системата. Тук бяха представени примери за дискриминация между диви и културни видове, между ендемични сортове и породи, между модерни сортове и линии, между мутантни линии, произхождащи от високо хомогенна линия, вътре в рамките на селекционни линии, както и между родители и тяхното F1 поколение. По този начин беше демонстрирано, че с използването на тази система може да се постигне нужното ниво на диференциация в зависимост от целите на съответното изследване – било селекционни, било за РХС тестиране.

4. Време и трудоемкост

Поради своя мултилокусен характер ISSR системата продуцира значителен брой полиморфни фрагменти в рамките на една реакция. Нашите изследвания показаха, че в контекста на българските селекционни материали правилният подбор на праймери може да доведе до получаването на 10 и повече полиморфни фрагмента в една реакция, което прави времето и използвания труд за получаване на достатъчно информация достатъчно кратко. Личният ни опит показва, че от постъпването на растителните/животински проби в лабораторията до получаването на резултатите е необходим период от 1 до максимум 2 дни (при брой на пробите – до 20). Естествено, с увеличаване броят на пробите необходимото време се увеличава, но това става главно за сметка на времето за екстракция на ДНК, докато самото провеждане и документиране на ISSR реакции става значително по-бързо. Още повече, че използваната апаратура позволява едновременното анализиране на до 96 проби.

5. Стабилност на работата във времето и условията (чувствителност към фините промени в протокола или условията)

Както вече беше коментирано по-горе, тук демонстрирахме високата стабилност на ISSR системата във времето. Нещо повече, тъй като при провеждането на изследванията са вземали участие редица докторанти и дипломанти, очевидно неизбежно въвежданите от тях фини промени в протокола и условията не оказват влияние на крайния резултат.

6. Гъвкавост на метода, възможност за вариране на броя на пробите и/или броя на маркерите

В рамките на представените в настоящия труд вариации по отношение на използваните организми, броят на анализирани проби и броят на поучените полиморфни фрагменти при различните растителни и животински форми беше демонстрирана както индиферентността на ISSR маркерната система към произхода на изследваните проби, така и възможностите за бързо и ефективно нарастване броя на изследваните проби и получаваните маркери според нуждите и целите на съответния анализ.

7. Интерпретацията на получените данни е независима от оборудването

Тъй като ISSR реакциите произвеждат ясни ивици с бинарно проявление (наличие/отсъствие) интерпретацията на получените резултати е достатъчно лесна и безспорна. Както беше демонстрирано от представените по-горе резултати, идентификацията на полиморфните ивици може да стане лесно и от хора с минимални познания и специализирана подготовка. Представените от нас резултати са получени при използването на 3 различни PCR апарата, няколко различни екстракционни кита, различни комбинации от електрозахранващи блокове и електрофорезни вани с вариращи размери. Въпреки всички тези вариации в използването оборудване получените данни позволяват лесна съпоставимост и, съответно, включване в обобщаващи анализи.

8. Устойчивост на базите данни

Този критерий има ниска приложимост спрямо ISSR маркерната система, тъй като получаването на този тип маркери може да става и без предварителното наличие на бази от данни. От своя страна получаваните резултати могат да се агрегират в бази данни с изключително опростена структура, което от своя страна ги прави устойчиви на деградиране дори и при многократна и многоползвателска употреба/редактиране/попълване.

9. Достъпност на методологията

Представената методология е изключително лесна за прилагане и изисква съвсем минимален набор от апаратура за молекулярна биология (PCR апарат, електрофорезна вана, центрофуга, трансилуминатор) и умения от персонала. Това се потвърждава и от участието на десетките дипломанти, преминали през лабораторията на АУ и обучени за използването ѝ в рамките на разработването и защитите на техните дипломни работи, базирани на разнообразните приложения на ISSR маркерите.

10. Независимост на конкретна машина, специфична химия, конкретен доставчик, конкретни партньори или продукти

Изпълнението на този критерий беше вече донякъде демонстрирано при анализа на изпълнението на критерии 1 и 2. Ще припомним, че от нас бяха използвани 3 различни вида PCR апарати, няколко различни кита за екстракция на ДНК, разнообразни набори от химикали за PCR реакции и т.н., при което получаваните резултати са напълно сравними, независимо от това кои са били доставчици на съответните продукти;

11. Подходящи за автоматизация

Поради своя доминантен характер и значителни количества на получаваните продукти ISSR реакциите произвеждат ясни ивици, които са едновременно лесни за отчитане от операторите. Същевременно това ги прави и лесни за автоматизиране, тъй като в системите за автоматизирано отчитане на резултатите е наложително да се задава прагова стойност на силата на получавания сигнал. Когато за самите оператори определянето на всеки един сигнал има само два варианта (наличие/отсъствие) и, когато наличието е лесно за установяване, определянето на тези прагови стойности става лесно. Едновременно с това се облекчава и необходимата периодична проверка/валидиране на автоматично събирането резултати.

11. Подходящи за мултиплексиране

Поради самата си същност ISSR реакциите не са особено подходящи за мултиплексиране. Това се дължи основно на техния мултилокусен характер, при което с използването само на един праймер се получават много на брой продукти (от 4 до 18, наблюдавани в нашите експерименти). От друга страна самият факт на получаването на такъв висок брой продукти е резултат от амплифицирането именно на значителен брой локуси едновременно, което е и основната цел на мултиплексирането на реакциите при използването на монолокусни маркери.

12. Рентабилни (разходите, броят на пробите и броят на маркерите са балансирани)

Както беше демонстрирано при значителния брой култури и при двете автохтонни породи животни, използвани в настоящото изследване, получаването на достатъчен обем информация (в зависимост от целите на анализа) при използването на ISSR маркерната система може да стане с помощта на много малък брой реакции. Тъй като системата използва принципа на PCR, необходимото количество ДНК е много малко и може да се получи от 50-80 mg растителна тъкан или няколко космени луковици. Това прави самата ДНК екстракция сравнително евтина (за разлика от RFLP анализа), което води до по-ниска обща цена на ISSR анализа. Донякъде подобно на AFLP анализа при използването на ISSR маркерната система често е достатъчно включването само на един праймер (една

двойка праймери при AFLP) за да се получи достатъчно добро характеризирание на генетичното разнообразие в изследвания набор от генотипове. За разлика от AFLP анализите, обаче, за провеждането на ISSR реакциите не е необходимо двукратното вместено провеждане на PCR реакциите, което отново прави цената на ISSR анализа по-ниска. Дори и в случаите, когато са необходими повече от една реакции, техният брой рядко надхвърля 3-4, което пък е обичайно за провеждането на SSR анализите. Много често при последните това е и причината да се търсят възможности за мултиплексиране, за да може крайният брой на провежданите реакции да се понижи. Това, освен, че води до редукция на използваните консумативи, води и до значително понижаване на необходимото време за извеждане на анализите, което е и основното причина изискването за възможност за мултиплексиране да е изведено като основно за този тип маркерни системи.

Всичко, посочено по-горе, заедно с ниските изисквания към апаратурата и квалификацията на персонала, който може да изпълнява този рад анализи, прави ISSR маркерната система значително по-ефективна от използваните за сравнение в настоящото изследване SSR, AFLP и RFLP маркери. Тази ефективност е по отношение както на процедурите за РХС тестирането, така и при използването им за селекционни цели, което още веднъж подчертава гъвкавостта на системата по отношение приложението ѝ в различни изследователски контексти.

За разлика от ISSR маркерите, резултатите, получавани от изпитаните лokus-специфични маркери потвърждават тезата, изказана и от други автори, че немалка част от публикуваните маркери са неподходящи за непосредствена употреба при разнообразна генплазма. Често се налагат допълнителни стъпки, с цел тяхното успешно приложение, отчасти и поради причини като загуба на комплементарните сайтове на праймерите вследствие на точкови мутации, прекъсване на връзката между тях и търсения ген, дължащо се на рекомбинация или разлики в условията за провеждане на PCR. Независимо, че доматът е типично самоопрашващ се вид, дори в стабилизирани по РХС линии се наблюдава известна остатъчна хетерогенност (Bredemeijer et al., 2002; Cooke et al., 2003). Вероятността за точкови мутации, които не нарушават функцията на гените, не е пренебрежима и, ако подобна мутация настъпи в участък от гена, касаещ използвания маркер, е възможно неговата приложимост да не бъде пълна, дори и ако е създаден спрямо секвенцията на съответния ген.

Изводи

Настоящото изследване представя разликите в приложението на няколко вида молекулни маркери. По-специално, то демонстрира способността на ISSR като инструмент за идентифициране на сортове в редица култури и две автохтонни породи кози. Тъй като ISSR системата е предложена отдавна, но не е достатъчно проучена досега в български контекст, тук е направена оценка на капацитета на набор от праймери да произвеждат полиморфизъм в основни за страната местни култури и породи. Въпреки това ще е необходима допълнителна фина настройка на техниката, преди да може да бъде приложена в пълния си капацитет – при PXS тестване, защита на правата на селекционерите, сортиране на колекции на селекционери и генни банки от излишни записи, разработване на генотип “лични карти” и др. Основните изводи в представеното изследване могат да бъдат обобщени като:

1. До настоящото проучване няма налични MAS инструменти с демонстрирана практическа приложимост за българските селекционни и развъдни програми, тъй като разработените извън страната са базирани на чужда зародишна плазма, а проучванията в страната са в начален стадий. Използвайки зародишна плазма, която е най-разпространена за съответната целева култура/порода в страната, това изследване предоставя знания и инструменти, необходими за поддържане на конкурентоспособността на българските селекционни програми.
2. Нашето проучване потвърждава приложимостта на ISSR маркерната система в селекцията на растения, тъй като демонстрирахме как използването на един праймер може да доведе до ранно потвърждение на хибридната природа на F1 индивидите, както и откриването на тези с нехибриден произход. Това може да бъде от голяма полза при култури като домати, където F1 популациите обикновено се установяват чрез разсаждане и такова ранно откриване на отклоняващи се индивиди може да спести скъпо място за експерименти и да намали нуждите от квалифицирана работна ръка в ранните етапи на селекционната програма. Ефектите се умножават за случаите, когато отклоняващите се характеристики се унаследяват като рецесивни белези и по този начин тяхното най-ранно идентифициране чрез фенотипиране е възможно едва в F2 поколението.
3. Използвайки едни от най-важните търговски сортове в страната при култури като памук, домати, ечемик, царевица и пшеница, това изследване се опитва да предостави знания и инструменти,

необходими за поддържане на конкурентоспособността на българските селекционни програми в институтите на ССА.

4. Прилагането на ISSR маркерната система разкрива не само достатъчни полиморфизми между различни растителни и животински генотипове, но е в състояние да идентифицира отклоняващи се индивиди в колекции от образци и сред F1 индивиди. Това демонстрира способността на предложената техника за разкриване на различията дори в рамките на предполагаемо силно хомогенни генотипове като самоопрашващите се сортове от видовете *Solanum lycopersicum*.
5. Резултатите, представени в този труд, показват, че ISSR маркерите могат ефективно да диференцират генотипове дори в рамките на фенотипно силно хомогенни популации от растителни, микроорганизми и животински организми. Това е най-детайлно представено в случаите с памук, домати и кози.
6. ISSR маркерите са способни не само да идентифицират разнообразието в изследваните генотипове, но също така носят потенциала за ефективно идентифициране на индивиди с различни метаболитни профили в рамките на различни сортове/породи.
7. ISSR бяха използвани ефективно за диференциране на различни видове и хибриди в *Paulownia* sp. Тяхната ефективност в рода е демонстрирана чрез разграничаване на *P. elongata* и *P. elongata* x *P. elongata* хибрид.
8. Използването на ISSR молекулярни маркери е ефективно за диференциацията на изолати в рамките на родовете *Fusarium* и *Phytophthora*.
9. Въпреки сравнително малкия размер и дългата история на инбридинг в двете изследвани местни породи кози, беше разкрито значително разнообразие, установено чрез молекулярни маркери. Проведените молекулярни анализи разкриха, че ISSR маркерната система може да идентифицира значително генетично разнообразие сред автохтонните породи.
10. Лекотата на използване и високата надеждност на системата я правят много добър кандидат за практическо приложение в програми за селекция на растения и животни.
11. AFLP маркерите притежават висок капацитет за дискриминиране на индивиди в селекционните колекции, включително такива, работещи с ограниченото налично в страната разнообразие на местни образци. Поради това те бяха ефективно използвани за насищане

на геномната карта на памука, където SSR и RFLP предоставиха първоначалната рамка за картиране.

12. Въз основа на своята висока възпроизводимост и полиморфно съдържание, SSR маркерите бяха приложени за изучаване на колекции от памук и домати и за идентифициране на локуси, свързани с ключови качествени характеристики на тези култури.
13. CAPS маркерът (с праймери Tm2RS-f3 и Tm2RS-r3) може успешно да бъде приложен за идентифициране на алелното състояние на *tm-2*, *Tm-2* и *Tm-2*² в селекционни линии домати. Приложението му, обаче, е ограничено до конкретен генетичен контекст и се лимитира допълнително от изискването за по-високи нива на квалификация от персонала в самата процедура за неговото установяване.

Приноси

Теоретични приноси

1. Въз основа на редица параметри (полиморфно информационно съдържание, равномерност на разпределението по дължината на геномите, възпроизводимост, надеждност и др.) е идентифицирана молекулярна маркерна система, имаща капацитета да изпълнява изискванията на различните направления на използване.
2. Разработени са методики за използването на ISSR маркерната система при редица културни растения, два еукариотни фитопатогена и две автохтонни породи животни.
3. В рамките на настоящия труд за първи път в известната ни литература е доказана способността на ISSR маркерната система да идентифицира вътревидово разнообразие при фитофторови гъби, с което се разкриват нови възможности за разработването на по-ефективни системи за детекция и идентификация на тази група фитопатогени.
4. Характеризирана е способността на набор от доминантни (т.е. AFLP, ISSR, CAPS) и ко-доминантни (RFLP, SSR) молекулярни маркерни системи за детекция на генетичното разнообразие в редица растителни и животински организми с местен произход.
5. Чрез използването на сравнителен анализ са установени предимствата и недостатъците на всяка една система в зависимост от планираната насока на използване – за селекционни, развъдни или за целите на регистрацията и поддържането биоразнообразието на съответните организми.

Приложни приноси

1. Идентифицирана е молекулярна маркерна система (ISSR), която има широк диапазон на приложение в селекционните програми на местни форми растения и животни, както и за детекцията и идентификацията на фитопатогенни организми.
2. Демонстрирана е приложимостта на ISSR маркерната система за анализ на генетичното разнообразие при голям набор от растителни, микроорганизмени и животински организми, като така е доказана нейната универсалност по отношение използването при еукариоти в такъв контекст.
3. Чрез извеждането на сравнителни анализи е доказана ефективността на приложението на ISSR маркерната система в селекционните програми на редица култури с национално значение и в две автохтонни породи кози.
4. Демонстриран е потенциалът на ISSR маркерната система за ефективно използване както за целите на селекцията, така и за целите на държавното сортоизпитване, апробация и семеконтрол (при растенията) и за независимата сертификация и развъждане на местни породи животни.
5. Детайлно е характеризирано съответствието на ISSR маркерната система на системата от критерии, използвана от UPOV, за определяне приложимостта на различни маркерни системи за целите на РХС тестирането, като така е доказана нейната приложимост в системите на ИАКАС и ИАСРЖ.
6. Получени са нови асоциации маркер/признак за редица стопански ценни признаци при местни сортове памук и домати.
7. Картирани са значителен брой молекулярни маркери при памука като така значително е обогатена съществуващата генетична карта с локуси, имащи съществени ефекти в местните агроекологични условия.
8. Идентифицирани са съществен брой локуси за количествени признаци в местни образци, при което са установени и такива с плейотропни ефекти върху редица качествени и количествени признаци.
9. Характеризирано е генетичното разнообразие в две автохтонни породи (Българска виторога дългокосместа и Калоферска дългокосместа) кози на ниво наследствен материал като са дадени препоръки за бъдещото развъждане на двете породи, така че да се намалят рисковете от близкородствено кръстосване, потенциално водещи до инбредна депресия.

Abstract

Since the 1990s, a number of DNA-based molecular markers have been available, whose potential for practical application has been repeatedly discussed by both their developers and the numerous researchers who have explored their applicability in various organisms - wild and cultivated plants and animals, as well as a variety of micro-organisms. Their ability to facilitate both conventional breeding and efforts aimed at accelerating the development of new organisms that meet the rapidly changing environmental conditions and market requirements are identified and well-documented. As a result, a number of marker systems have been used for years to accelerate the selection process, ensuring the genetic identity of breeding materials and the protection of the intellectual property in large breeding companies. Due to the high initial development and application costs, the use of these marker systems by research groups relying on public funding in our country has been limited. With the development of DNA sequencing and amplification technologies, the cost of using marker systems is reduced in geometric progression, and this toolkit is becoming easily accessible from both financial and technological aspects. However, in the Bulgarian state institutes and universities involved in breeding efforts, their use continues to be too limited. The same applies to the institutions responsible for the registration and control of the planting material (EASPASC) and the breeding material in animals (EAABR). At the heart of the problem is the lack of standardization of used systems and protocols between the two groups of institutions due to the different requirements for the functioning of each of them.

The Author's many years of experience with the use of a number of marker systems in a wide range of organisms allows him to formulate a hypothesis for solving the problem so identified, the defending of which is the subject of the present dissertation. It summarizes various applications of several dominant (i.e. AFLP, ISSR, CAPS) and co-dominant (RFLP, SSR) marker systems. This includes the use of the two types of markers to analyze the genetic diversity of different germplasm, together with the creation and offering of approaches for DNA genotyping of a number of crops, microorganisms and two autochthonous animal breeds. The arguments for the selection of one or the other instrument are presented in the context of the relevant studies as they were done by the author.

The present work summarizes the author's diverse efforts to make the molecular instruments understandable and usable for the Bulgarian breeding community in its main profiles - crop and livestock.

In conclusion, the use of ISSR markers as a toolkit, equally appropriate for the examination and conservation of genetic diversity, in the breeders' rights protection and in the state variety testing (in the DUS testing of candidate varieties assessment) is proposed.