АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ ПЛОВДИВ

ФАКУЛТЕТ ПО АГРОНОМСТВО

КАТЕДРА ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА, БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА

Тодорка Ангелова Сребчева

Анализ на гени, отговорни за синтеза на капсаицин, при пипера (род *Capsicum*)

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност „Генетика”, професионално направление 6.1.

Научен ръководител:

Доц. д-р Божин Божинов

ПЛОВДИВ, 2022 год.

Полските опити и изследванията са проведени през периода 2018-2021 година на УОВБ на Аграрен университет, гр. Пловдив и в лабораторията по молекулярна биология към катедра ФРБГ.

Дисертацията е написана на 130 страници и съдържа 47 фигури, 11 таблици. Цитираната литература включва 266 източника на латиница.

Дисертационния труд е обсъден и предложен за защита на разширено заседание на катедра „Физиология на растенията, биохимия и генетика“ при факултета по Агрономство на Аграрен университет – Пловдив.

Официалната защита на дисертацията ще се състои на …….. от …….. часа на заседание на Специализирано научно жури в Аграрен университет – Пловдив с членове:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Малгожата Берова

Доц. д-р Любка Колева

Външни членове:

Проф. д-р Даниела Ганева

Доц. д.с.н. Самир Наимов

Доц. д-р Елена Апостолова-Кузова

УВОД

Пиперът (р. *Capsicum*) една от най-отглежданите зеленчукови култури, както в България, така и в световен мащаб. Масовото му култивиране се дължи на неговата хранителна стойност, висока адаптивна способност, продуктивността му, както и на съдържанието на полезни за здравето на човека вещества.

Капсаициноидите са вторични метаболити, използвани като компонент в хранителни добавки и фармацевтични продукти. Има промишлени приложения като аерозол, част от полицейското оборудване, както и за борба с вредители.

Биосинтезът на капсаициноиди е уникална способност на видовете от род *Capsicum*. Те са отговорни за усещането на лютивия вкус (пикантността) в плодовете. В най-голямо количество (около 69%) се синтезира капсаициноидът капсаицин, които заради високото си съдържание е станал нарицателно на всички негови аналози.

Анализирането на структурните гени в биосинтетичния път на капсаицина, спомага за изясняване на генетичната основа на лютивината и загубата ѝ. Лютивината е както качествена, така и количествена характеристика. Степента ѝ зависи от концентрацията на капсаициноидите, които се натрупват и се унаследява количествено, докато способността на плода да бъде лютив или сладък се контролира от доминантните и рецесивни алели на няколко гена. Идентифицирането на мутантни алели в гените с качествен ефект върху капсаицин синтеза и тяхното манипулиране дава възможност за скрининг и производство на плодове с конкретни вкусови качества – лютиви или сладки.

Анализирането и контролирането на гените, отговорни за производството на капсаицин, би спомогнало за увеличаване разнообразието и идентифициране на форми пипер с различно съдържание или липса на този алкалоид. За да се определи приоритетът в отглеждане на лютиви или сладки пипери е важно да се изследва биоразнообразието на българските форми и сортове пипер. Оценката на

генетичната свързаност и вариации е от решаващо значение за ефективното управление и подобряване на културните растения.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Съдържа следните раздели:

- Произход и разпространение на пипера (род *Capsicum*)
- Икономическо значение на пипера
- Класификация на пипера (род *Capsicum*)
- Екологична роля на капсаицина
- Структура и биосинтез на капсаицина
- Генетичен контрол на биосинтеза
- Физични фактори, влияещи на капсаицин синтеза
- Молекулярно-генетични методи за анализ
- Индуциране на мутации

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е **да се определи алелното състояние на български форми пипер по отношение на локуси, определящи нивата на капсаицин и да се идентифицира наличието на известни и/или нови локуси, модифициращи капсаицин синтеза при тях.**

За постигането на тази цел беше планирано изпълнение на следните основни задачи:

1. Установяване наличието на алели на гена *Pun1* (*pun1-1*, *pun1-2* и/или *pun1-3*) в родителските форми пипер.
2. Провеждане на насочени кръстоски между избраните родителски форми.
3. Проследяване на унаследяването в F_1 и F_2.
4. Проучване за наличие на допълнителни локуси с ефект върху капсаицин синтеза.
5. Проследяване връзката между генетичната принадлежност и биосинтеза на капсаицин при отделните родителски форми (*C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия, *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, *C. annuum* L. – сорт Фамилия, *C. frutescens* L., *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес), F_1 и F_2 на избрани кръстоски.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

1. 1. Изходен растителен материал – семена пипер: сортове Пловдивска капия, Фамилия и ИЗК Деликатес от вида *Capsicum annuum* L.; *Capsicum chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *Capsicum frutescens* L.

1.2. Отглеждане на растителен материал

1.2.1. Производство на разсад

1.2.2. Полско отглеждане на растителния материал

1.2.2.1. Агрометеорологична характеристика

1.2.2.2. Полско отглеждане на изходния растителен материал

1.2.2.3. Полско отглеждане на хибридите F_1

1.2.2.4. Полско отглеждане на F_2

2. Експериментални методи

2.1. Кръстосано опрашване

2.1.1. Схема на кръстосване

- ♀ *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х ♂ *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро
- ♀ *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х ♂ *C. frutescens* L.
- ♀ *C. annuum* L. – сорт Фамилия х ♂ *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро
- ♀ *C. annuum* L. – сорт Фамилия х ♂ *C. frutescens* L.
- ♀ *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х ♂ *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро
- ♀ *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х ♂ *C. frutescens* L.

2.1.2. Изкуствена хибридизация

2.2. Семепроизводство

2.2.1. Производство на семена за F_1

2.2.2. Производство на семена за родителските линии

2.2.3. Производство на семена за F_2

2.3. Органолептичен анализ на плодовете на изходните форми пипер, F_1 и F_2 на избрани кръстоски

3. Лабораторни анализи

3.1. Екстракция на ДНК от родителските форми, F_1 и F_2 – за изолацията на ДНК беше използван екстракционен кит E.Z.N.A. Plant DNA Kit на OmegaBio-Tek.

3.2. Визуализиране на изолираната геномна ДНК – чрез електрофоретично разделяне на продуктите в 1% агарозен гел, оцветен с EtBr и фотографиран под УВ светлина.

3.3. Установяване алелното състояние на гена *Pun1*

3.3.1.Прймери – секвенции:

- pun1-1 fwd 1 – TCCTCATGCATCTCTTGCAG
- pun1-1 fwd2 – GCTCCACGGAAAAGACTCAT
- pun1-1 rev – CAAATGGCAGTTTCCCTTCTCTCATT
- pun12 fwd – TTCCCATATAGCCCACTTGC
- pun1-2 rev – GATGGAACTAAAGCTGTTGTCGTATG
- pun1-3 fwd – GTAGTTTTTCGGAAATGAAAAGTACT
- pun1-3 rev 1 – CACGCCTTGCCCAGCTTTGTAATCTT
- pun1-3 rev 2 – TCATGTCCATTCGGCCAAACAGTG

3.3.2. PCR реакции за разграничаване на алелите на *Pun1*

3.3.2.1. PCR реакция за разграничаване на алела *pun1-1*

3.3.2.2. PCR реакция за разграничаване на алела *pun1-2*

3.3.2.3. PCR реакция за разграничаване на алела *pun1-3*

3.4. Амплифициране на фрагмент от *Pun3*

3.4.1. Праймери – секвенции на *Pun3*-CAPS маркер:

- *Pun-3*-CAPS_F ATGGTGAGAACACCTTGCTAC
- *Pun-3*_R CTCCCTCTTCTTCAGGCCAATCTA

3.4.2. PCR реакция за амплифициране на фрагмент от гена *Pun3*

3.5. ISSR анализ

3.5.1. Праймери:

- ISSR P7 AC(8)YG
- ISSR P14 AG(8)YT
- ISSR P11 GA(8)YC
- ISSR P8 AC(8)G
- ISSR PE6 AC(8)CTG

3.5.2. ISSR PCR реакции

3.6. Анализ на PCR продуктите

3.6.1. Приготвяне на буфер за електрофореза (TBE 0.5x)

3.6.2. Приготвяне на агарозен гел

3.6.3. Електрофоретично разделяне на молекулите

3.6.4. Визуализиране на продуктите

3.7. Пречистване на ДНК фрагменти (част от *Pun3*) от агарозен гел – чрез набор от реактиви ISOLATE II PCR and Gel Kit (BIOLINE)

3.8. Секвениране на амплифицирани фрагменти – по метода на Сангер, чрез капилярна електрофореза на флуоресцентно маркирани ДНК-фрагменти в лаборатория на Bio Basic Inc в Markham, Ontario, Canada..

4. Методи за обработка на получените данни

4.1. Статистическа обработка на данните от органолептичния анализ и PCR реакцията за определяне на алелното състояние на *Pun1* при растения F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро – чрез статистически показател χ^2.

4.2 Статистическа обработка на данните от ISSR анализа – създаване на йерархични клъстери със статистически пакет "SPSS за Windows".

4.3 . Биоинформатичен анализ

4.3.1. Анализ на кодиращите региони от *Pun3* – на база на информацията получена от NCBI (National Center for Biotechnology Information).
4.3.2. Сравняване на секвенциите с референтни геноми – в Sol Genomics Network, с помощта на BLAST.

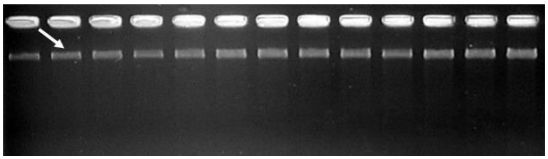
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Установяване наличието на алели на гена *Pun1* в родителските форми пипер.

Биосинтезът на капсаицина е сложен и изисква междинни съединения от два различни метаболитни пътя, които накрая се комбинират, като реакцията на кондензация се контролира от ацилтрансфераза, кодирана от гена *Pun1*. Той е основният ген, който качествено контролира този процес. Мутации в *Pun1* водят до загуба на лютивина в плодовете. Над един век са продължили изследванията на алелния състав при лютиви и сладки пипери. Напредъкът в биотехнологиите сега прави възможен генетичния анализ на гените и идентифицирането на рецесивните алели, чрез използване на молекулярни маркери и директно секвениране. Мутациите в *Pun1* локуса са най-често срещащите се, предпочитани и използвани в селекцията на сладки пипери, поради тяхното качествено унаследяване.

За да бъде установено алелното състояние на гена *Pun1* (*pun1-1*, *pun1-2* и/или *pun1-3*) в родителските форми пипер бяха извършени серия от ДНК анализи. В реакциите бяха използвани алел-специфични PCR праймери известни по литературни данни, които откриват функционалните нуклеотидни полиморфизми на различните мутантни алели на *Pun1*. Беше анализирана геномна ДНК от трите български сорта нелютив пипер (*C. annuum L.* – сорт Пловдивска капия, сорт Фамилия и сорт ИЗК Деликатес) и двата лютиви (*C. chinense Jacq.* – тип Хабанеро и *C. frutescens L.*).

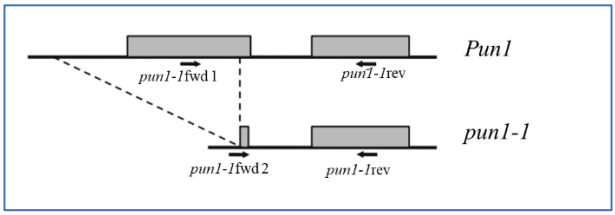
Получената при екстракцията ДНК бе със сходно качество (без деградирали фрагменти) и в приблизително еднакви количества (в повечето случаи между 300 и 500 ng геномна ДНК). Когато количеството или качеството на получената ДНК се считаше за незадоволително, екстракцията се извършваше отново, за да се удовлетворят посочените параметри (Фиг. 1).



Фигура 1. Резултати от екстракцията на геномна ДНК с екстракционен кит E.Z.N.A. Plant DNA Kit на OmegaBio-Tek: Стрелка – визуализирани продукти при образци, използвани в изследването.

1.1. Анализ за наличието на алела *pun1-1*

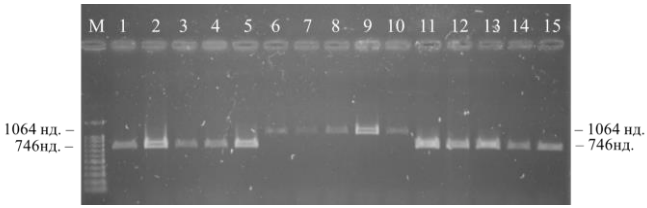
Известно е, че алелът *pun1-1* е отговорен за липсата на пикантност в *C. annuum* L. в резултат на делеция с размер 2,5 кб, обхващаща промотора и голяма част от първи екзон. За надеждно разграничаване на алела *pun1-1* от другите алели на *Pun1* беше използван 3-праймерен PCR маркер. Чрез позиционирането на първия прав праймер (*pun1-1*fwd1) в промоторната област и обратния праймер (*pun1-1*rev) във втори екзон, амплифицирането се случва само в отсъствието на тази мутация. Тъй като в този случай праймерите обхващат голяма част от гена, продуктът, който се амплифицира е с големина 1064 нд. Вторият прав праймер (*pun1-1*fwd2) се свързва преди мутиралата област. В комбинация с обратния праймер (*pun1-1*rev) се амплифицира продукт само когато мутацията *pun1-1* е налице. Продуктът е с големина 746 нд. С цел амплифициране на продукти единствено от активния ген, обратният праймер е проектиран в регион, съдържащ съществени разлики от секвенцията на псевдогена *catf2* (Фиг. 2).



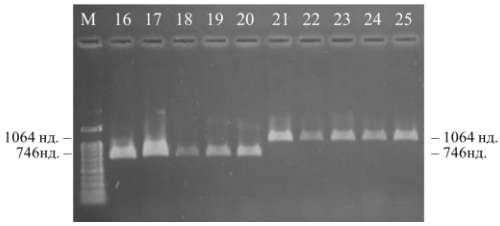
Фигура 2. Алел-специфичен маркер за разграничаване на алела *pun1-1* – области на свързване на праймерите *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev.

Геномна ДНК на по пет растения от петте изходни форми беше подложена на PCR реакция с цел установяване наличието на рецесивния алел *pun1-1*. Резултатите бяха визуализирани и снимани под UV светлина (Фиг. 3 и Фиг. 4). При сладките български сортове пипер от вида *C. annuum* L. бяха амплифицирани продукти с големина 746 нд. По литературни данни фрагментите с тази големина отговарят на наличието на рецесивния алел *pun1-1*. При всяка една от пробите на сладки пипери фрагментът беше само един, което показва липсата на друг от известните алели. Следователно може да се заключи, че при изследваните сладки пипери, алелът *pun1-1* е в хомозиготно състояние (*pun1-1*/*pun1-1*). При тях липсата на лютивина, респективно на синтез на капсаицин, се дължи на преминаването на тази мутация в хомозиготно състояние.

При *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L. бяха амплифицирани продукти с големина 1064 нд. Получените резултати показват отсъствие на *pun1-1*. При тези проби е възможно наличието, както на доминантния алел *Pun1*, така и на друг негов рецесивен алел (*pun1-2* или *pun1-3*).



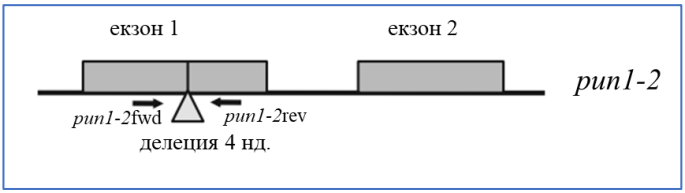
Фигура 3. PCR реакция с праймери: *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev за установяване наличието на рецесивния *pun1-1* в родителските форми: M – 100 нд. молекулярен маркер, старт 1 – 5 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия – продукт с големина 746 нд.; старт 6 – 10 – лютив пипер *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро – продукт с големина 1064 нд.; старт 11– 15 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Фамилия – продукт с големина 746 нд.



Фигура 4. PCR реакция с праймери: *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev за установяване наличието на рецесивния *pun1-1* в родителските форми: M – 100 нд. молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225), старт 16 – 20 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес – продукт с големина 746 нд.; старт 21 – 25 – лютив пипер *C. frutescens* L. – продукт с големина 1064 нд.

1.2. Анализ за наличието на алела *pun1-2*

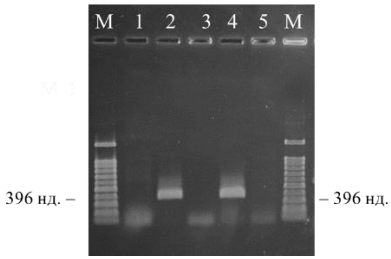
Използваният маркер за установяване наличието на рецесивния *pun1-2* открива делецията от 4 нд, характерна за този алел. Двата праймера са проектирани, така че да обграждат тази делеция в екзон 1. При наличие на мутацията се амплифицира фрагмент с размер 392 нд, а при отсъствието ѝ се амплифицира фрагмент с 4 нд по-голям – 396 нд. Продукти с големина 396 нд. се амплифицират, както при наличие на доминантния алел *Pun1*, така и при наличие на рецесивния *pun1-3*. При наличие на рецесивния *pun1-1* не се амплифицира продукт, тъй като неговата голяма делеция включва амплифицираната област (Фиг. 5).



Фигура 5. Алел-специфичен маркер за разграничаване на алела *pun1-2* – области на свързване на праймерите *pun1-2*fwd и *pun1-2*rev.

За установяване наличието на мутантния алел *pun1-2* беше проведена PCR реакцията с общи проби от петте екстрахирани ДНКи от петте изходни форми. След PCR реакцията с праймерите *pun1-2*fwd

и *pun1-2*rev бяха амплифицирани продукти само при лютивите пипер *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L. (Фиг. 6).



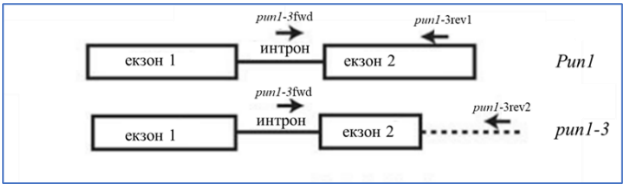
Фигура 6. PCR реакция с праймери: *pun1-2*fwd и *pun1-2*rev за установяване наличието на рецесивния *pun1-2* в родителските форми: M – 100 нд. молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225), старт 1 –сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия – няма продукт; старт 2 – лютив пипер *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро – продукт с големина 396 нд.; старт 3 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Фамилия – няма продукт; старт 4 – лютив пипер *C. frutescens* L. – продукт с големина 396 нд.; старт 5 — сладък пипер *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес – няма продукт.

Трудно беше да се определи точната големина на фрагментите при старт 2 и 4 (392 нд или 396 нд). При лютивите пипери е задължително наличието на поне един доминантен алел *Pun1*. Възможно е двата продукта (с големина 392 нд и 396 нд) да се припокриват, което не изключва наличието и на двата алела *Pun1* и *pun1-2* заедно. По литературни данни (Wyatt et al, 2012) бендове с големина 396 нд са индикатор за наличието на дивия тип алел *Pun1* или рецесивния *pun1-3*. При лютивите пипери алелът *pun1-3* също има възможност да присъства в хетерозиготно състояние. В старт 1, 3, и 5, при сладките български сортове пипер от вида *C. annuum* L., фрагменти не се наблюдаваха. Тези резултати още веднъж потвърждават, че липсата на лютивина при тях се дължи на хомозиготно състояние на алела *pun1-1* (*pun1-1*/*pun1-1*).

1.3. Анализ за наличието на алела *pun1-3*

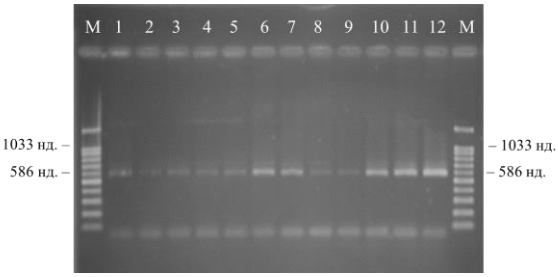
При алела *pun1-3* в *C. frutescens* L. голяма делеция във втори екзон води до загубата на 70 аминокиселини в *Pun1* протеина. Алелът не се транскрибира, нито транслира. За установяване наличието на *pun1-3*, беше използван 3-праймерна PCR маркерна система.

Праймер *pun1-3*fwd се свързва в интронната област между екзон 1 и екзон 2. Праймер *pun1-3*rev1 се свързва в екзон 2, при наличие на дивия тип алел *Pun1*. Използването на тази праймерна двойка води до амплифицирането на продукт с големина 586 нд. Праймер *pun1-3*rev2 се свързва в геномната последователност в близост до мястото на мутацията *pun1-3*. В комбинация праймери *pun1-3*fwd и *pun1-3*rev2 произвеждат продукт с големина1033 нд, при наличие на рецесивен алел *pun1-3* (Фиг. 7).

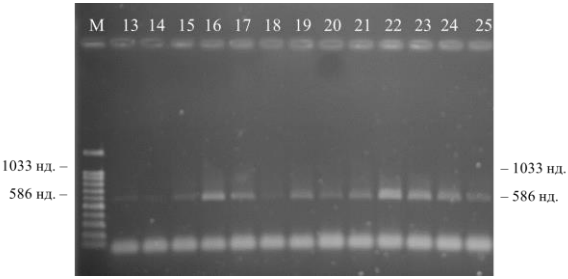


Фигура 7. Алел-специфичен маркер за разграничаване на алела *pun1-3* – области на свързване на праймерите *pun1-3*fwd, *pun1-3*rev1 и *pun1-3*rev2.

При реакцията за установяване на рецесивния алел *pun1-3*, с помощта на праймерите *pun1-3*fwd, *pun1-3*rev1 и *pun1-3*rev2 при всички 25 старта се амплифицираха бендове с големина 586 нд. По литературни данни те показват наличие на алелите *Pun1*, *pun1-1* или *pun1-2*, а липсата на бенд с размер 1033 нд е индикация за отсъствието на алела *pun1-3* (Фиг. 8, Фиг. 9).



Фигура 8. PCR реакция с праймери: *pun1-3*fwd, и, *pun1-3*rev1 и *pun1-3*rev2 : M – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); старт 1–5 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия; старт 6 – 10 – лютив пипер *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; старт 11 и 12 сладък пипер *C. annuum* L. – сорт. Фамилия.



Фигура 9. PCR реакция с праймери: *pun1-3*fwd, *pun1-3*rev1 и *pun1-3*rev2: M – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); старт 13 – 15 – сладък пипер *C. annuum* L. – сорт Фамилия; старт 16 – 20 – лютив пипер *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; старт 21 – 25 сладък пипер *C. annuum* L. — сорт ИЗК Деликатес.

Проведените анализи за установяване алелното състояние на *Pun1* показват, че при български сортове Пловдивска капия, Фамилия и ИЗК Деликатес загубата на лютивина се дължи на наличието на най-широко разпространения мутантен алел – *pun1-1*. При *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L. е възможно доминантния алел *Pun1* да

е в хомозиготно състояние (*Pun1/Pun1*) или да присъства в комбинация с рецесивният *pun1-2* (*Pun1/ pun1-2*).

2. Провеждане на насочени кръстоски между избраните родителски форми.

2.1. Избор на родителски форми

Сред култивираните пипери се отделя специално внимание на най-разпространения и икономически важен вид *C. annuum* L., който включва както форми с лютиви (лют пипер) и така и с не-лютиви (сладък пипер) плодове. Селектираните и отглеждани в България сортове принадлежат именно към този вид, като повечето от тях са със сладки плодове. Следователно, подробната характеристика на неговото фенотипно и генетично разнообразие е ключово. В тази връзка за изходен растителен материал бяха избрани именно такива сладки сортове пипер (*C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия, сорт Фамилия и сорт ИЗК Деликатес). За да бъде проследено унаследяването на гените и техните мутантни алели, отговорни за липсата на лютивина в F_1 и F_2, като родителски форми бяха избрани и два вида пипер с алтернативното проявление на признака (лютивите *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L.).

2.2. Отчитане на хибридизацията

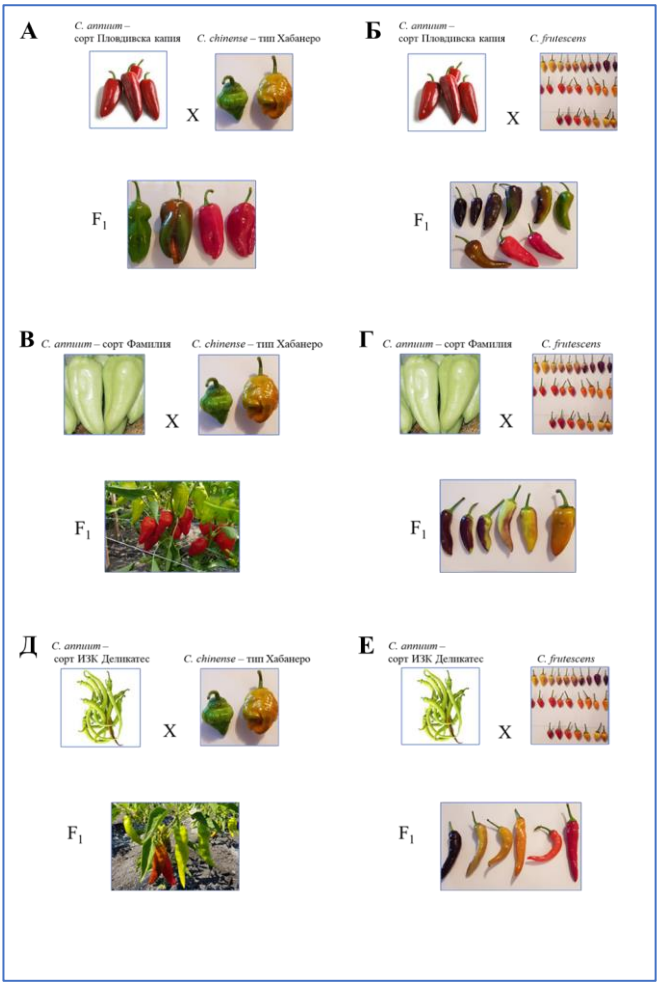
След извършените 260 прости кръстоски, чрез контролирано опрашване бяха получени 102 плода. Изчислена е ефективността на хибридизацията при всяка една от кръстоските (Табл. 1). Най-ефективна е хибридизацията при кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. frutescens* L. – 57,5%, а най-нисък е процентът на ефективност при кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро –15%. Този резултат показва, че използвания метод за хибридизация е задоволително ефективен. Броят развити плодове и семената в тях бяха достатъчни за провеждане на изследването. Семена от всички развити плодовете бяха използвани за производство на F_1 поколение.

Таблица 1. Резултати от проведената хибридизация

Кръстоски	Брой извършени кръстоски	Брой развити плодове	Ефективност в %
C. annuum L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense Jacq.* – тип Хабанеро	40	8	20
C. annuum L. – сорт Пловдивска капия х *C. frutescens L.*	40	23	57,5
C. annuum L. – сорт Фамилия х *C. chinense Jacq.* – тип Хабанеро	40	6	15
C. annuum L. – сорт Фамилия х *C. frutescens L.*	50	26	52
C. annuum L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. chinense Jacq.* – тип Хабанеро	40	11	27,5
C. annuum L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens L.*	50	28	56

2.3. Фенотипно проследяване на унаследяването в F_1.

За да бъде доказано успешното провеждане на хибридизацията беше наблюдаван фенотипът на плодовете на растенията от F_1 поколение. Качествените признаци, като цвят и форма на плодовете лесно бяха определени визуално и послужиха като оценка за резултата от кръстосването. Бяха отгледани по 25 F_1 растения от всяка от шестте кръстоски. Плодовете на растенията от всяка една от кръстоските бяха с напълно еднакъв фенотип. Тази хомогенност при проявлението на качествените признаци показва хибридната природа на получените растения (Фиг. 10).



Фигура 10. Форма и цвят на плодовете на растения F_1 от проведените кръстоски – **А**. *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; **Б**. *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. frutescens* L.; **В**. *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; **Г**. *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. frutescens* L.; **Д**. *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; **Е**. *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.

2.4. Хибридни популации

След извършване на контролирано самоопрашване на кръстоските F_1 се развиха 69 плода (Табл. 2).

Таблица 2. Резултати след самоопрашване на F_1

Кръстоски F_1	**Брой развити плодове (самоопрашени)**
C. annuum L. – сорт Пловдивска капия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро	11
C. annuum L. – сорт Пловдивска капия x *C. frutescens* L.	8
C. annuum L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро	8
C. annuum L. – сорт Фамилия x *C. frutescens* L.	10
C. annuum L. – сорт ИЗК Деликатес x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро	12
C. annuum L. – сорт ИЗК Деликатес x *C. frutescens* L.	20

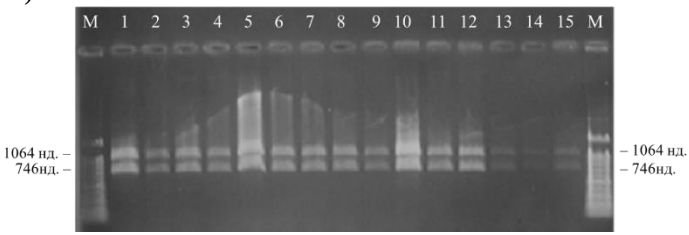
В резултат на това беше произведено достатъчно количество семена за производство на растения от всички кръстоски. Въпреки това, за анализ на гените, отговорни за биосинтез на капсаицин, в F_2 бяха избрани хибридните популации *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес x *C. frutescens* L.

3. Проследяване унаследяването на признака лютивина в F_1 и F_2.

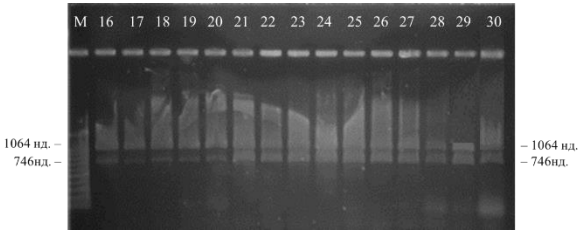
3.1. Определяне алелния състав на гена *Pun*1 при F_1

Тъй като беше определен генотипа на родителските форми (*pun1-1/pun1-1* и *Pun1/Pun1*) и не беше установено наличието на *pun1-2* и *pun1-3,* PCR реакцията беше проведена с алел-специфични праймери за

установяване наличието на *pun1-1*. В реакцията беше използвана геномна ДНК от по пет растения от всяка от шестте кръстоски. Резултатите бяха визуализирани под UV светлина. Амплифицираха се продукти както с големина 746 нд така и с големина 1064 нд (Фиг. 11 и Фиг. 12).



Фигура 11. PCR реакция с праймери: *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev за определяне на алелното състояние на *Pun1* при F_1 на кръстоските: M – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); старт 1 – 5 *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; старт 6 –10 – *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия x *C. frutescens* L.; старт 11–15 – *C. annuum L.* – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро.

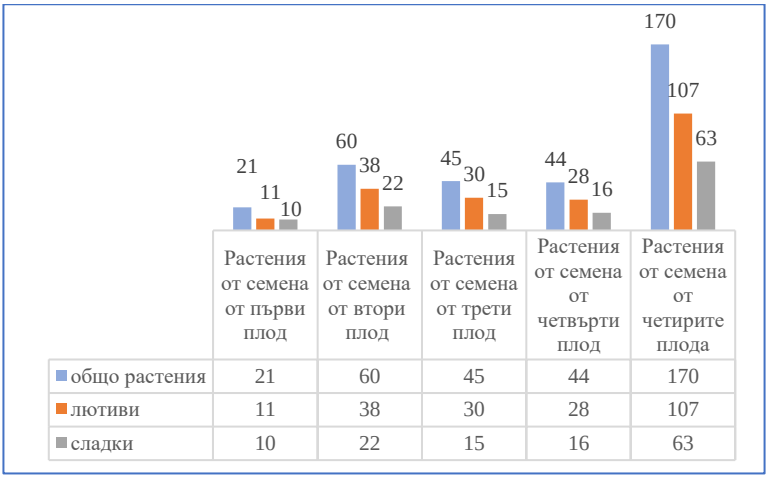


Фигура 12. PCR реакция с праймери: *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev за определяне на алелното състояние на *Pun1* във F_1 на кръстоските: M – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); старт 16 – 20 – *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. frutescens* L.; старт 20 – 25 – *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; старт 26 – 30 – *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес x *C. frutescens* L.

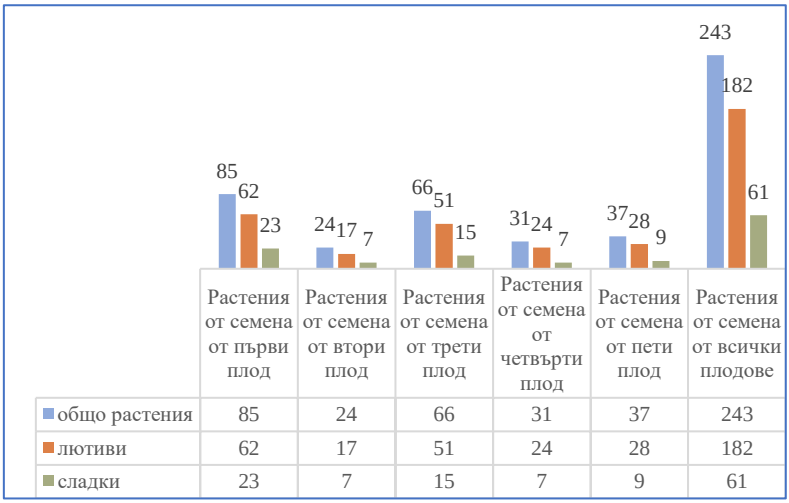
При всички стартове се амплифицираха продукти с големина 746 нд. и 1064 нд. По литературни данни фрагмент с големина 746 нд показва наличие на алела *pun1-1*, а фрагмент с големина 1064 нд наличие на алела *Pun1*. Тези резултати, показват, че кръстоските са проведени успешно и хибридните растения са хетерозиготни с генотип *Pun1*/*pun1-1*.

3.2. Органолептичен анализ.

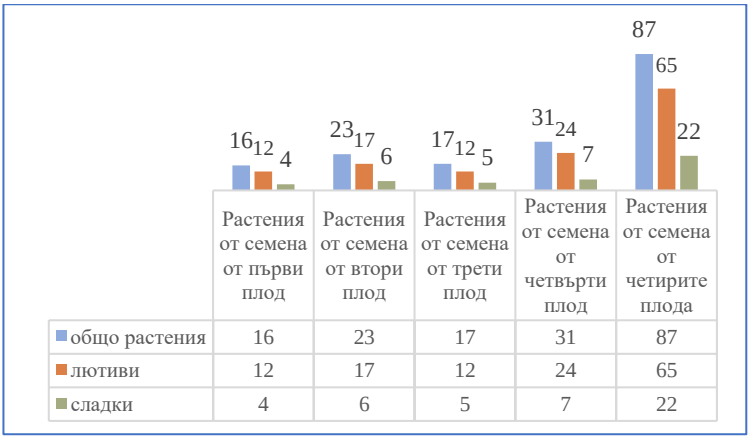
Органолептично беше анализирано присъствието и отсъствието на капсаицин в плодовете на родителските форми, F_1 и F_2 на кръстоските. При родителските форми беше установено наличие на капсаицин в плодовете от всички растения *C. chinense Jacq.* – тип Хабанеро и *C. frutescens* L. (усеща се лютивина) и отсъствие в плодовете от всички растения *C. annuum* L.– сорт Пловдивска капия, сорт Фамилия и сорт ИЗК Деликатес (не се усеща лютивина). При всички плодове на растения F_1 (от кръстоските *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. frutescens* L.; *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро; *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. frutescens* L.; *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.) беше установено наличие на капсаицин (усеща се лютивина). При растенията от F_2 на трите кръстоски (*C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.) беше получено разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете. Данните от извършения органолептичен анализ са използвани за сравняване на получените от експеримента резултати (Фиг. 13, Фиг. 14 и Фиг. 15) и предвижданията на избраната хипотеза.



Фигура 13. Резултати от органолептичния анализ на F_2 растения от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро: Брой растения със сладки и лютиви плодове.



Фигура 14. Резултати от органолептичния анализ на F_2 растения от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро: Брой растения със сладки и лютиви плодове.



Фигура 15. Резултати от органолептичния анализ на F_2 растения от кръстоската *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.: Брой растения със сладки и лютиви плодове.

3. 3. Статистическа обработка на данните от органолептичния анализ

Хипотезата, допусната в настоящото изследване е, че биосинтезът на капсаицин в избраните видове и сортове се контролира от доминантен ген *Pun1*. Беше установен генотипа на родителски форми (лютивите пипери са хомозиготни доминантни – *Pun1/Pun1*, а сладките хомозиготни рецесивни *pun1-1/pun1-1*). Чрез органолептичен анализ плодовете на всички растения от F_1 бяха определени като лютиви. Техният генотип също беше установен – *Pun1/pun1-1*. В F_2 се очакваше ¾ от растенията да са с лютиви плодове, а ¼ със сладки.

След като бяха сравнени получените в експеримента данни с очакваните резултати, се наблюдаваха вариации в много широки граници. За оценка на отклоненията беше използван статистически показател χ^2. Получените данни се разминават съществено от теоретичните, ако χ^2 надхвърля определената критична стойност при 5%-тен праг на достоверност на допускането. Определянето на тази критична стойност става на базата на честотното разпределение на вероятностите. Критичните стойности за различен брой класове се изчисляват в зависимост от степените на свобода на уравнението. Степента на свобода на уравнението е равна на (n-1), където n е броят

на разглежданите фенотипни класове (в случая те са два – растения с лютиви и със сладки плодове). Беше сравнена стойността на χ^2 при степен на свобода: n-1 = 2-1=1.

3.3.1 Статистическа обработка на данните от органолептичния анализ на плодовете от растенията F_2 *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро

При плодовете на растенията от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро се наблюдаваше разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете. Данните от извършения органолептичен анализ бяха използвани за сравняване на получените от експеримента резултати и предвижданията на избраната хипотеза (лютивината на плодовете се контролира от единичен доминантен ген *Pun1*). Очакваха се ¾ от растенията да бъдат с лютиви плодове, а ¼ със сладки. Получените данни показаха, че от общо 243 анализирани растения 183 растения са с лютиви плодове, а 60 са със сладки плодове. За сравняване на получените в експеримента данни с очакваните резултати и оценка на отклоненията и тук беше изчислен статистически показател χ^2 (Табл. 3). Стойността на показателя χ^2 = 0,021, при степен на свобода =1 е много под критичната стойност от 3,841.

Таблица 3. Стойност на показателя χ^2 при хипотеза „разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете в съотношение 3:1“ в F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро

параметри	**лютиви**	**сладки**	**∑**
p (наблюдавани)	183	60	243
q (очаквани)	182	61	243
$\frac{(p-q)^2}{q}$	0,005	0,016	χ^2 = 0,021

Можем да приемем, че данните от експеримента при тази кръстоска са в съответствие с предвижданията на избраната хипотеза. Разпадането на проявлението на признака лютивина на плодовете е в очакваното съотношение 3:1.

3.3.2. Статистическа обработка на данните от органолептичния анализ на плодовете от растенията F_2 *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.

Получените данни при F_2 растенията на кръстоската *C. annuum* L. – ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L. показват, че от анализираните 87 растения 65 са с лютиви плодове, а 22 са със сладки плодове. Тук отчетените резултати изцяло съвпадат с очакваните и стойността на показателя $\chi^2 = 0$ (Табл. 4).

Таблица 4. Стойност на показателя χ^2 при хипотеза „разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете в съотношение 3:1“ в F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.

параметри	**лютиви**	**сладки**	$\sum$
p (наблюдавани)	65	22	87
q (очаквани)	65	22	87
$\frac{(p-q)^2}{q}$	0	0	$\chi^2 = 0$

Разпадането на проявлението на признака лютивина на плодовете е в очакваното съотношение 3:1 и данните от експеримента и при тази кръстоска са в съответствие с предвижданията на избраната хипотеза.

3.3.3. Статистическа обработка на данните от органолептичния анализ на плодовете от растенията F_2 *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро

Изчисленията при F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро показаха, че стойността на показателя χ^2 = 13,945 (Таблица 7). При степен на свобода = 1, тази стойност значително надхвърля критичната стойност от 3,841, което индикира проблем с извеждането на експеримента или отхвърля хипотезата.

Таблица 5. Стойност на показателя χ^2 при хипотеза „разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете в съотношение 3:1“ в F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро

параметри	**лютиви**	**сладки**	∑
p (наблюдавани)	107	63	170
q (очаквани)	128	42	170
$\frac{(p-q)^2}{q}$	3,445	10,5	χ^2 = 13,945

Получените данни от органолептичния анализ на растенията F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро показаха, че разпадането на проявлението на признака лютивина на плодовете не е в очакваното съотношение 3:1.

Тъй като данните от експеримента при тази кръстоска не са в съответствие с предвижданията на избраната хипотеза, се наложи хипотезата да бъде променена.

Липсата на капсаициноиди, респективно на лютивина в плодовете е свързана с наличието на мутации в гените *Pun2, pAMT,*

CaKR и *Pun3* (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2019). Тъй като тези гени кодират продукти функциониращи преди етапа на капсаицин синтез (кодиран от *Pun1*), то не функционирането на някой от тях би имал епистатичен ефект върху *Pun1*. Предвид факта, че *Pun3* кодира транскрипционния фактор CaMYB31, който регулира експресията на *Pun1* и основните капсаициноидни биосинтетични гени, беше прието да бъдат потърсени доказателства за участието на му при разглежданата F_2 популация. Известно е, че той контролира лютивината в сладък пипер от вида *C. annuum L.*, чрез рецесивен нефункционален алел в хомозиготно състояние (Han et al., 2019). Ето защо следващото допускане, което беше направено е, че чрез рецесивен епистазис *Pun3* блокира експресията на *Pun1*. Ако приемем, че лютивият родител *C. chinense* – тип Хабанеро е с генотип $P_1P_1P_3P_3$, а сладкият родител *C. annuum L.* – сорт Пловдивска капия с генотип $p_1p_1p_3p_3$ или $p_1p_1P_3p_3$, то в F_1 ще имаме единствено растения с лютиви плодове, с генотип $P_1p_1P_3p_3$ или $P_1p_1P_3P_3$. Ако изолираният цвят е бил на растение, хетерозиготно и по двата гена (с генотип $P_1p_1P_3p_3$), в F_2 съотношението между растения с лютиви и със сладки плодове ще бъде в 9:7 (Фиг. 16).

Гамети	**P_1P_3**	**P_1p_3**	**p_1P_3**	**p_1p_3**
P_1P_3	$P_1P_1P_3P_3$ лютиви	$P_1P_1P_3\,p_3$ лютиви	$P_1p_1P_3P_3$ лютиви	$P_1p_1P_3p_3$ лютиви
P_1p_3	$P1P_1P_3p_3$ лютиви	$P_1P_1p_3\,p_3$ сладки	$P_1p_1P_3p_3$ лютиви	$P_1p_1p_3p_3$ сладки
p_1P_3	$P_1p_1P_3P_3$ лютиви	$P_1p_1P_3p_3$ лютиви	$p_1p_1P_3P_3$ сладки	$p_1p_1P_3p_3$ сладки
p_1p_3	$P_1p_1P_3p_3$ лютиви	$P_1p_1p_3\,p_3$ сладки	$p_1p_1P_3p_3$ сладки	$p_1p_1p_3p_3$ сладки

Фигура 16. Решетка на Пънет – Самоопрашване на растение с генотип $P_1p_1P_3p_3$ води до формирането на 16 възможни комбинации на генотипа и фенотипно разпадане в съотношение 9:7.

Чрез статистическия показател χ^2 бяха сравнени резултатите от органолептичния анализ и предвижданията на избраната хипотеза (чрез рецесивен епистазис *Pun3* блокира експресията на *Pun1* и разпадането

на проявлението на признака лютивина на плодовете в съотношение 9:7). Очакваха се $^{9}/_{16}$ от растенията да бъдат с лютиви плодове, а $^{7}/_{16}$ със сладки. Получените данни показаха, че от общо 177 анализирани растения 107 са с лютиви плодове, а 63 са със сладки плодове, при очаквани 96 лютиви и 74 сладки. Изчислената на база експериментални данни стойност на показателя χ^2 = 2,895, при степен на свобода = 1 е под критичната стойност от 3,841 (Табл. 6).

параметри	**лютиви**	**сладки**	$\sum$
p (наблюдавани)	107	63	170
q (очаквани)	96	74	170
$\frac{(p-q)^2}{q}$	1,260	1,635	χ^2 = 2,895

Таблица 6. Стойност на показателя χ^2 при хипотеза „разпадане на проявлението на признака лютивина на плодовете в съотношение 9:7“ в F_2 от кръстоската *C. annuum L.* – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро

Според получените резултати, можем да приемем, че данните от експеримента при тази кръстоска са в съответствие с предвижданията на хипотезата „разпад в съотношение 9:7“. Въз основа на направения до тук анализ виждаме, че резултатът от проведената кръстоска потвърждава направеното допускане, че в определянето лютивината и липсата на лютивина в плодовете участват едновременно два гена.

3.4. Определяне алелния състав на гена *Pun*1 при F_2

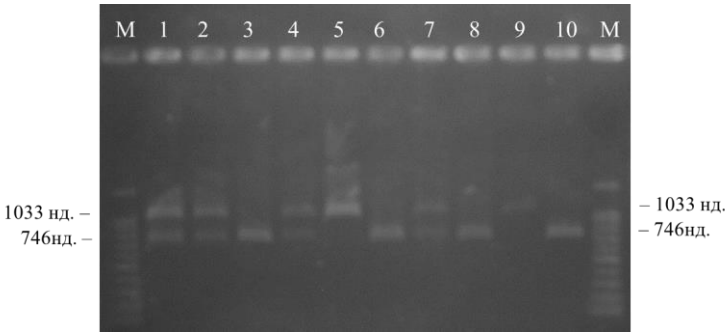
Предвид факта, че *Pun1* е основен ген, контролиращ лютивината в плодовете на пипера, за изясняване на неговата ролята в изследваните хибридни популации, беше определено алелното му състояние при F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и при растенията F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт

Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, чиито плодове бяха определените органолептично като сладки.

3.4.1. Определяне алелния състав на гена *Pun1* при F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро

Въпреки, че показателят χ^2 е обективен измерител за верността на избраната хипотеза, беше проведен и анализ на молекулярно ниво. Беше определен генотипа на 175 растения от F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро.

Чрез серия от PCR реакции беше установен алелния състав на гена *Pun1* при всяко растение. PCR реакциите бяха проведени с праймерите *pun1-1*fwd 1, *pun1-1*fwd 2 и *pun1-1*rev. Амплифициран продукт с големина 746 нд, при растенията със сладки плодове, показва хомозиготното състояние на алела *pun1-1* (*pun1-1/pun1-1*). Фрагмент с големина 1064 нд. отговаря на хомозиготното състояние на алела *Pun1* (*Pun1/Pun1*) – див тип. Присъствието и на двата фрагмента (с големина 746 нд и 1064 нд) показва наличие и на двата алела на гена, тоест генотип *Pun1/pun1-1*. Растенията с лютиви плодове показаха генотип *Pun1/Pun1* или *Pun1/pun1-1*, а растенията със сладки плодове генотип *pun1-1/pun1-1*. Резултатите от PCR реакциите (Фиг. 17) изцяло съвпаднаха с резултатите от органолептичния анализ.



Фигура 17. PCR реакция с праймери: *pun1-1*fwd1, *pun1-1*fwd2 и *pun1-1*rev за определяне на алелното състояние на *Pun1* при растения (1 – 10) F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро: М – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat. № 304225); 1 – продукти с размер 1064 нд. и 746 нд. – *Pun1/pun1-1*; 2 – продукти с размер 1064 нд. и 746 нд. – *Pun1/pun1-1*; 3 – продукт с размер 746 нд. – *pun1-1/pun1-1*; 4 – продукти 1064 нд. и 746 нд. – *Pun1/pun1-1*; 5 –продукт 1064 нд – *Pun1/Pun1*; 6 – 746 нд – *pun1-1/pun1-1*; 7 – продукти 1064 нд. и 746 нд. – *Pun1/pun1-1*; – продукт 746 нд. – *pun1-1/pun1-1*; 9 –продукт 1064 нд. – *Pun1/Pun1*; 10 – продукт 746 нд. – *pun1-1/pun1-1*

3.4.2. Статистическа обработка на данните от PCR реакцията за определяне алелния състав на гена *Pun*1 при F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро

Генотипираните по *Pun1* растения от F_2 (*C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро) бяха разделени в три групи: с генотип *Pun1/Pun1*, с генотип *Pun1/pun1-1* и с генотип *pun1-1/pun1-1* (Табл. 7).

Според избраната хипотеза (лютивината/липсата на лютивина на плодовете се контролира от единичен доминантен ген *Pun1*) в F_2 се очаква ¼ от растенията да са с генотип *Pun1/Pun1*, $^2/_4$ от растенията да са генотип *Pun1/pun1-1* и ¼ с генотип *pun1-1/pun1-1*.

Таблица 7. Резултати от генотипирането на растения F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро – номера на растения с генотип *Pun1/Pun1*, *Pun1/pun1-1* и *pun1-1/pun1-1*

	Растения с генотип *Pun1/Pun1*	**Растения с генотип *Pun1/pun1-1***	**Растения с генотип *pun1-1/pun1-1***
Номер на растение	5, 9, 15, 17, 28, 32, 38, 56, 57, 61, 62, 64, 66, 73, 79, 81, 83, 84 88, 89, 91, 93, 98, 104, 105, 110, 111, 114, 115, 116, 123, 1124, 132, 134, 138, 143, 150, 152, 155, 161, 167, 170	1, 2, 4, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 63, 65, 67, 69, 71 72, 75, 76, 77, 78, 80, 85, 86, 87, 90, 94, 97, 99, 100, 101, 103, 107 112, 117,119, 121, 122, 125, 126, 127, 129, 130, 131, 135, 136, 137, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 149, 151, 153, 154, 157, 159, 160, 162, 169, 171, 172, 173, 174	3, 6, 8, 10, 18, 19, 20, 22, 27, 36, 37, 41, 43, 44, 45, 46, 50, 59, 60, 68, 70, 74, 82 92, 95, 96, 102, 106, 108, 109, 113, 118, 120, 128, 133, 139, 148, 156, 158, 163, 164, 165, 166, 168,175
Легенда: - растения от семена от първи плод - растения от семена от втори плод - растения от семена от трети плод			

За сравняване на получените при PCR реакциите данни с очакваните резултати и оценка на отклоненията беше използван статистически показател χ^2. Стойността на показателя χ^2 = 0,123, при степен на свобода – 2 е много под критичната стойност = 5,991 (Табл. 8).

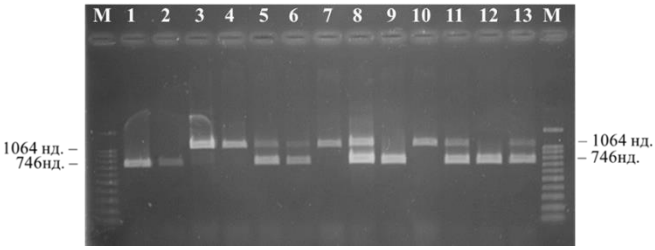
Таблица 8. Стойност на показателя χ^2 при хипотеза „разпадане по генотип *Pun1/Pun1*, *Pun1/pun1-1* и *pun1-1/pun1-1* в съотношение 1:2:1“ при F_2 от кръстоската *C. annuum L.* – сорт Фамилия х *C. chinense* – тип Хабанеро

Параметри	***Pun1/Pun1***	***Pun1/pun1-1***	***pun1-1/pun1-1***	∑
p (наблюдавани)	42	88	45	175
q (очаквани)	44	87	44	175
$\frac{(p-q)^2}{q}$	0,09	0,011	0,022	χ^2 = 0,123

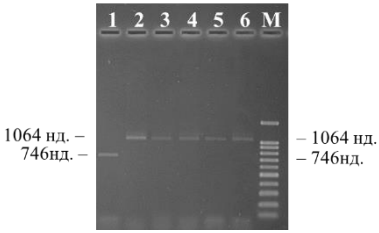
Можем да приемем, че резултатите от PCR реакциите при изследваните F_2 растения от кръстоската *C. annuum* L. – Фамилия х *C. chinense* Jacq. – Хабанеро са в съответствие с предвижданията на избраната хипотеза. На базата на извършените анализи може да бъде направено заключение, че липсата на капсаицин, респективно на лютивина в плодовете на българския сорт пипер Фамилия се дължи на преминаването в хомозиготно състояние на рецесивния *pun1-1*. Лютивият родител *C. chinense* Jacq. – Хабанеро е с генотип *Pun1/ Pun1*.

3.4.3. Определяне алелния състав на гена *Pun*1 при растения F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро

За да бъде анализирано влиянието на рецесивния *pun1-1*, върху загубата на лютивина при пиперите F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, с органолептично определени сладки плодове, те бяха генотипирани чрез PCR реакция, с помощта на три-праймерна система (*pun1-1fwd1 pu1-1fwd2* и *pun1-1rev*) за алел-специфичен маркер. На 68 броя F_2 растения (63 броя, органолептично определени като сладки и 5 броя лютиви, за контрола), беше определен алелния състав на гена *Pun1* (Фиг. 18 и Фиг. 19).



Фигура 18. PCR реакция за определяне алелното състояние на *Pun1* на растения F_2 (*C.annuum* – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро), с определени органолептично нелютиви плодове: М – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); Старт 1, 2, 9 и 12 – продукт с размер 746 нд, с генотип *pun1-1/pun1-1*.; Старт 3, 5, 6, 8, 11, 13 – продукти с размер 1064 нд. и 746 нд, генотип *Pun1/pun1-1*; Старт 4, 7 и 10 – продукти с размер 1064 нд, генотип *Pun1/ Pun1*.



Фигура 19. PCR реакция за определяне алелното състояние на *Pun1* на растения F_2 (*C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро) –Старт 1: растение № 169, с органолептично определени сладки плодове, фрагмент с големина 746 нд, генотип *pun1-1/pun1-1*; Старт 2-6 растения № 1, 2, 3, 162 и 166 с органолептично определени лютиви плодове, фрагмент с големина 1064 нд, с генотип *Pun1/Pun1*; М – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225).

Генетичният анализ на определените като нелютиви пипери F_2 от изследваната кръстоска, показва, че освен с очакваното състояние *pun1-1/pun1-1*, се наблюдават и растения с хетерозиготно (*Pun1/pun1-1*) и хомозиготно доминантно (*Pun1/Pun1*) състояние на гена *Pun1*. Тези

резултати още веднъж показват, че *pun1-1* не е единственият фактор, определящ липсата на лютивина при тях.

Анализът показва, че генотипът на използваните като контрола растения с органолептично определени лютиви плодове е *Pun1/Pun1*. Резултатът от тази PCR реакция съвпада с резултатите от направените до момента анализи.

4. Изследване за наличие на допълнителни локуси с ефект върху капсаицин синтеза.

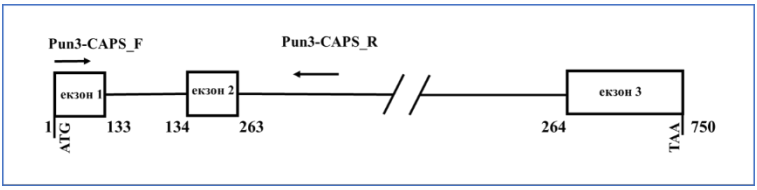
Данните от органолептичния анализ за съотношението на разпад между растения с лютиви и сладки плодове в F_2 кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро, не бяха в съответствие с предвижданията на избраната хипотеза (биосинтезът на капсаицин се контролира единствено от доминантен ген *Pun1*). Това наложи анализирането за наличие на допълнителен генетичен локус, който може да е в основата на блокирането на капсаициноидния биосинтез. Беше извършен генетичен анализ за установяване връзката между загубата на лютивина в плодовете на растенията от тази хибридна популация и участието на друг локус в контрола на този признак.

За да бъде установено, дали *Pun*3 е вторият ген, който контролира липсата на лютивина в хибридната популация, беше направена проверка за наличието на мутации в този локус.

4.1. Амплифициране и изолиране на фрагмент, част от гена *Pun3*

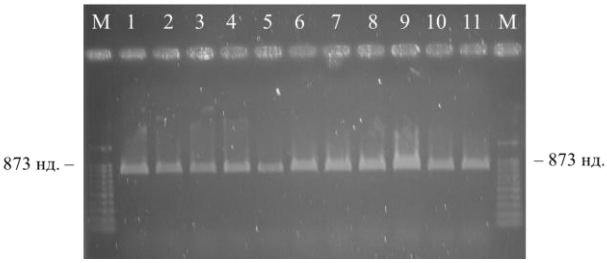
На генотипираните по *Pun1* 68 броя растения F_2 (63 с органолептично определени сладки плодове и 5 броя с лютиви плодове, като контрола) беше проведена PCR реакция за амплифициране и изолиране на фрагмент от гена *Pun3*.

За амплифициране на част от гена *Pun3* беше използван *Pun3*-CAPS маркер, разработен от Han и съавтори (Han et al. 2019). В тази част (включваща първи и втори екзон, интрона между тях и част от интрона между екзон 2 и екзон 3) е установена и докладвана единствената до момента мутация в този локус (Фиг. 20).



Фигура 20. Алел-специфичен маркер за разграничаване на алела *Pun3* – области на свързване на праймерите *Pun3*-CAPS_F и *Pun3*-CAPS_R – Последователността на кДНК на *Pun3* съдържа три екзона с размери 133, 130 и 484 нд. и два интрона.

След PCR реакцията, при всички 63 проби от растения F_2 се амплифицираха фрагменти с големина 873 нд (Фиг. 21). Фрагментите от агарозния гел бяха пречистени и секвенирани.



Фигура 21. PCR реакция с праймери: *Pun-3*-CAPS_F и *Pun-3*-CAPS_R : M – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat.-№ 304225); Старт 1-11 – F_2 (*C. annuum* L. - сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро).

4.2. Секвениране на фрагменти (част от *Pun3*)

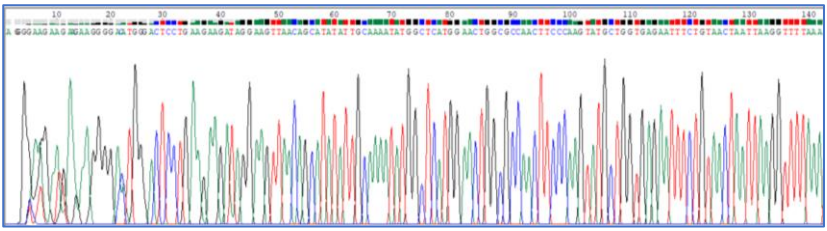
Бяха секвенирани фрагменти (част от *Pun3*) от растения, при които е установено присъствието на доминантния алел *Pun1*, но органолептично определени, като сладки. Най големият секвениран фрагмент от такава проба е 851 нд (Табл. 9). За да послужат като контрола бяха секвенирани и фрагментите от проби на растения с генотип *Pun1*/*Pun1* и *Pun1*/*pun1-1*, определени като лютиви и такива с установен алелен състав *pun1-1*/*pun1-1*, определени органолептично като сладки. Големината на секвенираните фрагменти на растения с

генотип *Pun1*/*Pun1* и *Pun1*/*pun1-1*, определени като лютиви, са с размер 846 нд, като разликата между тях и фрагмента с големина 851 нд е, че липсват последните 5 нд. Останалата част от секвенциите е напълно идентична. При проби от растения определени като сладки, с генотип *pun1-1*/*pun1-1*, секвенираните фрагменти са с големина 840 нд. Тук освен последните 5 нд, липсват и 6 нд от началото на секвенцията с големина 851 нд. Останалата част от секвенциите отново е напълно идентична. Тъй като след PCR реакцията при всички проби се амплифицираха фрагменти с еднаква големина, разликите в секвенциите биха могли да се отдадат на грешки при пречистване на фрагментите или при самото секвениране.

Таблица 9. Нуклеотидна последователност на фрагмент (част от *Pun3*) от растение, при което е установено присъствието на доминантния алел *Pun1*, но органолептично определено, като сладко – 851 нд.

AGGGGAAGAAGAAGAAGGGGACATGGGACTCCTGAAGAAGATAGGAAGTTAA
CAGCATATATTGCAAAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATG
CTGGTGAGAATTTCTGTAACTAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGCTGTTAATATT
CATTCATAAAATAATAATTACTCCTATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCAT
GAGATTACGAAAATATGAAATTTAGATATTTAAATCCAGTAAGCTTAAATCAG
ATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAATATCTTGTTGTTTTAAAT
ATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAGGAAATGACATTC
TTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATATATTGAAACGAAAGTACTTCTAT
ATTAGTATCATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGT
TGTTTTTTGGTGAATTAGGACTAGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGAT
GGATGAATCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAGGGAATTATACCAAAGAAGAA
GATGAAATCATCTTGAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACGTACTCTTC
TTCCACATGTCCGATTTACCTGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGA
GGTGTATTCAAAATTTGAATTTAATGAATTTAACTGTTAATATTTTTAAGATTGA
ACTCATTGAATCTAATATTTGCTAGGAGTCTAGAAAAATTAGTTCATATGAAAT
CATAGACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGAAGAAGAGGGAGAA

Хроматограмите от секвенирането не показват базов шум, а пиковете са сравнително добре различими (Фиг. 22).



Фигура 22. Хроматограма на секвениран фрагмент (851 нд) – част от фрагмента (142 нуклеотида)

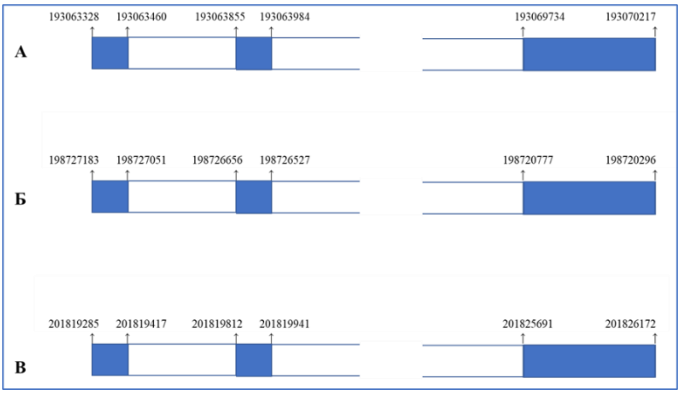
4.3. Местоположение и нуклеотидна последователност на *Pun3*

Проверка в NCBI (National Center for Biotechnology Information) показа, че там е налична информация единствено за кодиращите региони от *Pun3* (*Capsicum annuum* L. R2R3-MYB transcription factor 31 (MYB31), mRNA, GenBank: MF062086.1). Наличната секвенция беше разделена на три части, според големината на екзоните, известни по литературни данни (133 нд, 130 нд и 484 нд). Чрез BLAST в SolGenomics (https://solgenomics.net/) беше открито точното местоположение на *Pun3* (екзоните и интроните между тях) върху хромозома 7, при трите референтни генома (Zunla-версия 2.0, UCD10X-версия 1.0 и CM334-версия 1.55). Секвенциите (екзон 1 и екзон 2) на кодиращия регион съвпаднаха на 100% и при трите референтни генома. BLAST на секвенцията на екзон 3 показа съответствие от 99% с последователност от хромозома 7 на референтните геноми. Наблюдават се 6 нуклеотидни замени, на едни и същи позиции, между секвенцията на екзон 3 и трите референтни генома (Фиг. 23).

```
>Pepper1.55ch07
Length=231911496

 Score = 857 bits (464),  Expect = 0.0
 Identities = 478/484 (99%), Gaps = 0/484 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1          GTGGTCGGCGATTGCTGCTCACTTGCCAGGAAGATCAGACAATGAGATAAAGAATCATTG  60
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201825691  GTGGTCGGCGATTGCTGCTCACTTGCCAGGAAGATCAGACAATGAGATAAAGAATCATTG  201825750

Query  61         GCACACAAAACTTAAGAAGCGCGGTACTAGTTATGCGACAAACTCAAGTGATGGATCAAG  120
                  ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  201825751  GCACACAAAACTTAAGAAGCGCGGTACTAATTATGCGACAAACTCAAGTGATGAATCAAG  201825810

Query  121        CAAGAAATGTAAGAATAATACTAAGAAGAGGTATACTGAAAGTAATACCAATAAAAATAC  180
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201825811  CAAGAAATGTAAGAATAATACTAAGAAGAGGTATACTGAAAGTAATACCAATAAAAATAC  201825870

Query  181        AAGTCATAATAATATGCAGGAAAATATAGTACTGGAAAGTCCAGAATGGTCACCAAAGGA  240
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||
Sbjct  201825871  AAGTCATAATAATATGCAGGAAAATATAGTACTGGAAAGTTTAGAATGGTCACCAAAGGA  201825930

Query  241        ATCATCAAGTGAAGAACTCTCCTCTTACAGTACCACTAATTATCAACAGCAACATAAAGT  300
                  |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201825931  ATCATCAAGTGGAGAACTCTCCTCTTACAGTACCACTAATTATCAACAGCAACATAAAGT  201825990

Query  301        GTTTCAAGAGGAAATAACTAGTGGAAGCTTTTGGACAGAACCATTTGTAGTAGAAAGTTT  360
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201825991  GTTTCAAGAGGAAATAACTAGTGGAAGCTTTTGGACAGAACCATTTGTAGTAGAAAGTTT  201826050

Query  361        CAATACTACTAGAACTGATTTTCTAGCTCCTTCAATTGATTACTGTGGACTTGTGTGTCC  420
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201826051  CAATACTACTAGAACTGATTTTCTAGCTCCTTCAATTGATTACTGTGGACTTGTGTGTCC  201826110

Query  421        ACCTTCACCATATATAGGTCATGAATTTCTTTCCTCCTTTGACTTTGATCATTTTAATTA  480
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  201826111  ACCTTCACCATATATAGGTCATGAATTTCTTTCCTCCTTTGACTTTGATCATTATAATTA  201826170

Query  481        TTAA  484
                  ||||
Sbjct  201826171  TTAA  201826174
```

Фигура 23. Резултати от BLAST на кодираща секвенция (екзон 3) и референтен геном L – CM334 (версия 1.55).

Високият процент на съвпадение, местоположението (хромозома 7) и еднаквото отстояние между трите екзона и при трите референтни генома показва, че именно това са екзоните на *Pun3*. При трите референтни генома, обаче позициите им по хромозома 7 се различават (Фигура 24).



Фигура 24. Местоположение на локуса *Pun3* по хромозома 7, при трите референтни генома на *Capsicum annuum* L. – А. Местоположение на екзоните при референтен геном Zunla (версия 2.0); Б. Местоположение на екзоните при референтен геном UCD10X (версия 1.0); В. Местоположение на екзоните при референтен геном CM334 (версия 1.55).

След като беше определено местоположението на *Pun3*, беше намерена нуклеотидната последователност на фрагмента с големина 873 нд, ограничен от използваните праймери. Тази част включва екзон1, екзон 2, интрона между тях и част от интрона между екзон 2 и екзон 3.

За да тестват дали *CaMYB31* контролира лютивината в *C. annuum L.* – YCM334, Han и съавтори (Han et al., 2019) проектират CAPS маркера на базата на SNP в стоп кодона, открит от тях в този сладък пипер. Те подлагат PCR продукта на действието на рестриктаза *TaqI* и след електрофореза визуализират различен брой фрагменти, с различна големина, при пипери с различно проявление на признака. Рестрикционният ензим разпознава и реже в сайта T^CGA. При сладък пипер те наблюдават три фрагмента с големина 364 нд, 314 нд и 195 нд. При лютив пипер фрагментите са два – 559 нд и 314 нд. Местоположението на рестрикционните сайтове в секвенцията на референтните геноми на лютиви пипери (Фиг. 25) показва, че при разрязване в тези сайтове биха се получили три фрагмента с големина 364 нд, 314 нд и 195 нд. Фрагменти с тези големини, обаче Han и съавтори (Han et al., 2019) описват при пипер със сладки плодове.

```
201819285
ATGGTGAGAACACCTTGCTACGACGAAAATGGAATGAAGAAGGGGACATGGACTCCTGAAGAAGA
TAGGAAGTTAACAGCATATATTGCAAAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATGG
TGGTGAGAATTTCTGTAACTAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGTTGTTAATATTCATTCATAAAATA
ATAATTACTCCTATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCATGAGATTACGAAAACATGAAATTTAG
ATATTTAAATCCAGTAAGCTTAAATCAGATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAAT
ATCTTGTTGTTTTAAATATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAGGAAATGAC
ATTCTTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATAAATTGAAACGAAAGTACTTCTATATTAGTATC
ATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGTTGTTTTTTGGTGAATTAGGACT
AGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGATGGATGAATCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAG
GGAATTATACCAAAGAAGAAGATGAAATCATCTTGAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACG
TACTCTTCTTCCACATGTCCGATTTACCTGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGAGGTGT
ATTCAAAATTTGAATTTAATGAATTTAACTTTTAATATTTTTAAGATTGAACTCATTGAATCTAATA
TTTGCTAGGAGTCTAGAAAAATTAGTTCATATGAAATCATAAACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGA
AGAAGAGGGAG 201820157
```

Фигура 25. Секвенция на фрагмент, част от *Pun3*, ограничен с праймери *Pun-3*-CAPS_F и *Pun-3*-CAPS_R; местоположение при референтен геном CM334 (версия 1.55) – Нуклеотидна последователност на праймер *Pun-3*-CAPS_F – оцветен в червено; Нуклеотидна последователност на праймер *Pun-3*-CAPS_R – оцветен в зелено; Екзон 1 – в розово; Екзон 2 – в синьо; Интрони – в бяло; Рестрикционен сайт на *TaqI* – в жълто.

4.4. Сравняване на секвенираните фрагменти с референтни геноми

Сравнихме секвенираните фрагменти от растенията с нелютиви плодове (с генотип *Pun1*/*Pun1* и *Pun1*/*pun1-1*), лютивите (с генотип *Pun1*/*Pun1* и *Pun1*/*pun1-1*), както и от сладките (с алелен състав *pun1-1*/*pun1-1*) с референтни геноми на *Capsicum annuum* L. – CM334 (версия 1.55), UCD10X (версия 1.0) и Zunla (версия 2.0) в Sol Genomics Network. И при трите референтни генома съвпадението е 99%. Мястото на секвенцията по хромозома 7 изцяло отговаря на местоположението на локуса *Pun3*. На фигури 43 и 44, разликите между сравнените секвенции са отбелязани в жълто. В първи екзон се наблюдава делеция на T (тимин) и инсерция на G (гуанин). Тъй като тези точкови мутации се наблюдават при пипери с различен профил на лютивина и различен генотип на *Pun1*, очевидно делецията и инсерцията не са нонсенс мутацията в първи екзон, за която Han и съавтори споменават (Han et al., 2019). Други мутации в първи и втори екзон не се наблюдават. Виждат се общо пет нуклеотидни замени, които обаче се намират в некодиращ регион. Това предполага, че те не създават рецесивен *Pun3* алел и не оказват качествен ефект върху синтеза на капсаицин (Фиг. 26 и Фиг. 27).

```
>Pepper1.55ch07
Length=231911496

 Score = 1517 bits (821),  Expect = 0.0
 Identities = 836/843 (99%), Gaps = 2/843 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  8          GAA-GAAGAAGGGGACATGGGACTCCTGAAGAAGATAGGAAGTTAACAGCATATATTGCA  66
                  ||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819316  GAATGAAGAAGGGGACAT-GGACTCCTGAAGAAGATAGGAAGTTAACAGCATATATTGCA  201819374

Query  67         AAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATGCTGGTGAGAATTTCTGTAAC  126
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819375  AAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATGCTGGTGAGAATTTCTGTAAC  201819434

Query  127        TAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGCTGTTAATATTCATTCATAAAATAATAATTACTCCT  186
                  |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819435  TAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGTTGTTAATATTCATTCATAAAATAATAATTACTCCT  201819494

Query  187        ATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCATGAGATTACGAAAATATGAAATTTAGATATT  246
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  201819495  ATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCATGAGATTACGAAAACATGAAATTTAGATATT  201819554

Query  247        TAAATCCAGTAAGCTTAAATCAGATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAA  306
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819555  TAAATCCAGTAAGCTTAAATCAGATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAA  201819614

Query  307        TATCTTGTTGTTTTAAATATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAG  366
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819615  TATCTTGTTGTTTTAAATATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAG  201819674

Query  367        GAAATGACATTCTTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATATATTGAAACGAAAGTACT  426
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  201819675  GAAATGACATTCTTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATAAATTGAAACGAAAGTACT  201819734

Query  427        TCTATATTAGTATCATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGTT  486
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819735  TCTATATTAGTATCATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGTT  201819794

Query  487        GTTTTTTGGTGAATTAGGACTAGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGATGGATGAA  546
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819795  GTTTTTTGGTGAATTAGGACTAGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGATGGATGAA  201819854

Query  547        TCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAGGGAATTATACCAAAGAAGAAGATGAAATCATCTT  606
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819855  TCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAGGGAATTATACCAAAGAAGAAGATGAAATCATCTT  201819914

Query  607        GAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACGTACTCTTCTTCCACATGTCCGATTTACC  666
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819915  GAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACGTACTCTTCTTCCACATGTCCGATTTACC  201819974

Query  667        TGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGAGGTGTATTCAAAATTTGAATTTAATG  726
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819975  TGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGAGGTGTATTCAAAATTTGAATTTAATG  201820034

Query  727        AATTTAACTGTTAATATTTTTAAGATTGAACTCATTGAATCTAATATTTGCTAGGAGTCT  786
                  |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201820035  AATTTAACTTTTAATATTTTTAAGATTGAACTCATTGAATCTAATATTTGCTAGGAGTCT  201820094

Query  787        AGAAAAATTAGTTCATATGAAATCATAGACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGAAGAAGAGG  846
                  |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201820095  AGAAAAATTAGTTCATATGAAATCATAAACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGAAGAAGAGG  201820154

Query  847        GAG  849
                  |||
Sbjct  201820155  GAG  201820157
```

Фигура 26. Резултати от BLAST на секвенция (851 нд) от *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро (със сладки плодове и генотип *Pun1*/*Pun1*) при референтен геном *Capsicum annuum* L. – CM334 (версия 1.55). Секвенцията включва: част от първи екзон – 103 нд от 133 нд (оцветена в розово), целия втори екзон с големина 130 нд (оцветен в синьо), интрона между тях и част от втори интрон (не оцветени).

```
>Pepper1.55ch07
Length=231911496

 Score = 1511 bits (818),  Expect = 0.0
 Identities = 833/840 (99%), Gaps = 2/840 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  2          GAA-GAAGAAGGGGACATGGGACTCCTGAAGAAGATAGGAAGTTAACAGCATATATTGCA  60
                  ||| ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819316  GAATGAAGAAGGGGACAT-GGACTCCTGAAGAAGATAGGAAGTTAACAGCATATATTGCA  201819374

Query  61         AAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATGCTGGTGAGAATTTCTGTAAC  120
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819375  AAATATGGCTCATGGAACTGGCGCCAACTTCCCAAGTATGCTGGTGAGAATTTCTGTAAC  201819434

Query  121        TAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGCTGTTAATATTCATTCATAAAATAATAATTACTCCT  180
                  ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819435  TAATTAAGGTTTTAAATTGGTTTGTTGTTAATATTCATTCATAAAATAATAATTACTCCT  201819494

Query  181        ATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCATGAGATTACGAAAATATGAAATTTAGATATT  240
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  201819495  ATTTTATGTTTGTATTTCACTCTAGTTCATGAGATTACGAAAACATGAAATTTAGATATT  201819554

Query  241        TAAATCCAGTAAGCTTAAATCAGATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAA  300
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819555  TAAATCCAGTAAGCTTAAATCAGATATGTGAGTAATGTATTAAAATATATGTTTGGTGAA  201819614

Query  301        TATCTTGTTGTTTTAAATATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAG  360
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819615  TATCTTGTTGTTTTAAATATTTCATGTGAGATGTCGAATTTAAAGAATTAATAAATATAG  201819674

Query  361        GAAATGACATTCTTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATATATTGAAACGAAAGTACT  420
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  201819675  GAAATGACATTCTTCTAACAGACTAAAAAAATTAGACACATAAATTGAAACGAAAGTACT  201819734

Query  421        TCTATATTAGTATCATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGTT  480
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819735  TCTATATTAGTATCATATTCCATTATTGGAGAGTTCCAATGAAATAATTAACGGAATGTT  201819794

Query  481        GTTTTTTGGTGAATTAGGACTAGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGATGGATGAA  540
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819795  GTTTTTTGGTGAATTAGGACTAGCAAGGTGTGGAAAGAGCTGCAGACTTCGATGGATGAA  201819854

Query  541        TCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAGGGAATTATACCAAAGAAGAAGATGAAATCATCTT  600
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819855  TCACTTACGGCCAAATGTTAAAAGAGGGAATTATACCAAAGAAGAAGATGAAATCATCTT  201819914

Query  601        GAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACGTACTCTTCTTCCACATGTCCGATTTACC  660
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819915  GAACCTCCATGCTCAACTTGGAAATAGGTACGTACTCTTCTTCCACATGTCCGATTTACC  201819974

Query  661        TGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGAGGTGTATTCAAAATTTGAATTTAATG  720
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201819975  TGCTAATAGCACTGGTCAATGCTAGTTGAATTGAGGTGTATTCAAAATTTGAATTTAATG  201820034

Query  721        AATTTAACTGTTAATATTTTTAAGATTGAACTCATTGAATCTAATATTTGCTAGGAGTCT  780
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201820035  AATTTAACTTTTAATATTTTTAAGATTGAACTCATTGAATCTAATATTTGCTAGGAGTCT  201820094

Query  781        AGAAAAATTAGTTCATATGAAATCATAGACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGAAGAAGAGG  840
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201820095  AGAAAAATTAGTTCATATGAAATCATAAACAAAACGTTAGATTGGCCTCTGAAGAAGAGG  201820154
```

Фигура 27. Резултати от BLAST на секвенция (840 нд) от *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро (със сладки плодове и генотип *pun1-1*/*pun1-1*) при референтен геном *Capsicum annuum* L. – CM334 (версия 1.55). Секвенцията включва: част от първи екзон – 103 нд от 133 нд (оцветена в розово), целия втори екзон с големина 130нд (оцветен в синьо), интрона между тях и част от втори интрон (не оцветени).

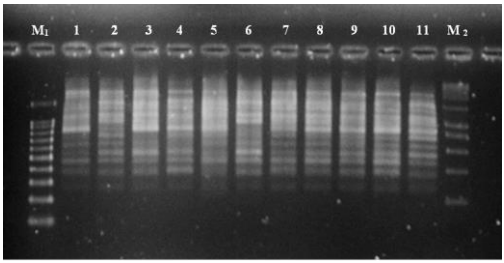
Липсата на разлики между секвенциите на растения с различен профил на лютивина и с различен алелен състав на *Pun1*, показва, че втория фактор, контролиращ липсата на лютивина, не се намира в разглежданата от нас част на *Pun3*. Противно на очакванията, мутация в първи и втори екзон на *Pun3* не е свързана с липсата на лютивина при изследваната хибридна популация F_2. Вторият ген засега остава неизвестен, неговото идентифициране предстои. Установяването му би спомогнало при маркер-асистираната селекция и би хвърлило светлина върху еволюцията на българските сладки пипери.

5. Проследяване връзката между генетичната принадлежност и биосинтеза на капсаицин при отделните родителски форми, F_1 и F_2.

5.1. ISSR анализ

За оценка на хетерогенността, съществуваща във всеки от изследваните генотипове, беше използван набор ISSR праймери, като бяха анализирани родителски форми *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия и *C. annuum* L. – сорт Фамилия и F_2 на кръстоските *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. и *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро. Бяха изследвани индивидуални растения от всеки един от тях, за да се потвърди възможността на избраната маркерна система за разкриване на достатъчен брой полиморфизми. След първоначален скрининг на праймерите, бе установено, че някои от тях не водят до получаването на амплифицирани фрагменти. Това може да се дължи на липса или малък брой на съответната микросателитна последователност в генома на изпитваните пипери.

Провеждането на реакциите с избраните праймери доведе до получаването на един или повече полиморфни фрагменти на реакция. Получаването на такива резултати можеше да се очаква поради ниските нива на генетично разнообразие при факултативно самоопрашващо се растение като пипера (Фиг. 28).



Фигура 28. Резултати от проведените ISSR реакции с ISSR праймер P14: M_1 – ДНК молекулярен маркер (RAINBOW extended DNA Ladder – Bioron, Cat. № 304225) -100 нд.; M_2 молекулярен маркер (Hyper Ladder – Bioline Lot. № H_1 618106A)-1кб.; Стартове 1-11 анализирани растения пипер.

Установяването дали отделните фрагменти са специфични за всеки генотип, предполага използване на сборни проби. От друга страна, използването на сборни проби би скрило нивото на хетерогенност в генотиповете, което би попречило на диференцирането на образците, ако в пробата има хетерогенни 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 нямахме предварителна информация за генотиповете, които бяха анализирани в това изследване, прибягнахме до сравнението само на индивидуални растения от всеки от изследваните пипери (родителски форми и F_2 на кръстоските *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия x *C. frutescens* L. и *C. annuum* L. – сорт Фамилия x *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро).

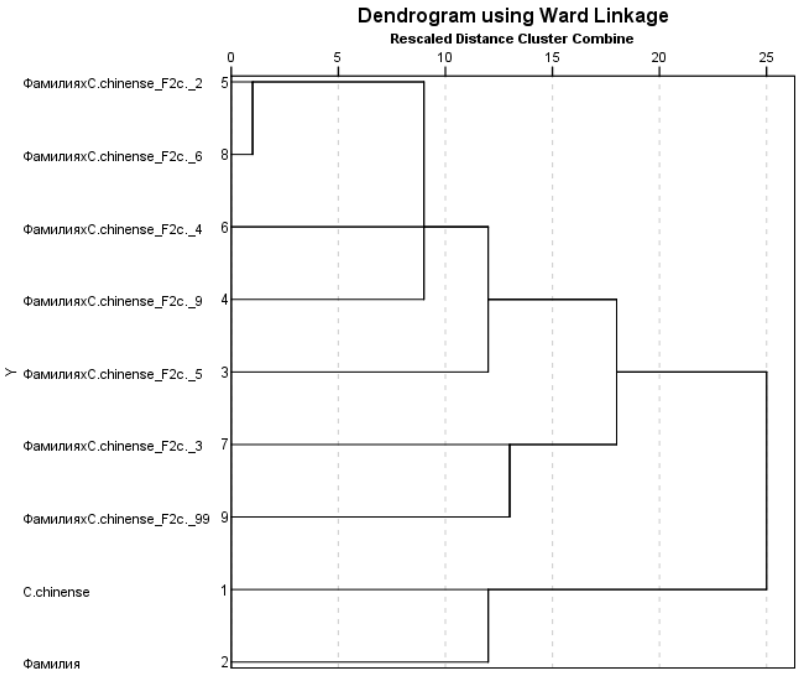
5.2. Анализ на генетичното разнообразие

Използването на ISSR праймерите доведе до получаването на определен брой полиморфни ивици. Резултатите от първоначалния скрининг демонстрират потенциала на избраната маркерна система да идентифицира различия и между отделните образци пипер. Присъствието на по–голям брой полиморфни ивици е желателно и необходимо условие за по-прецизното установяване на генетичното разнообразие сред тях. На базата на използваните 5 полиморфни ISSR

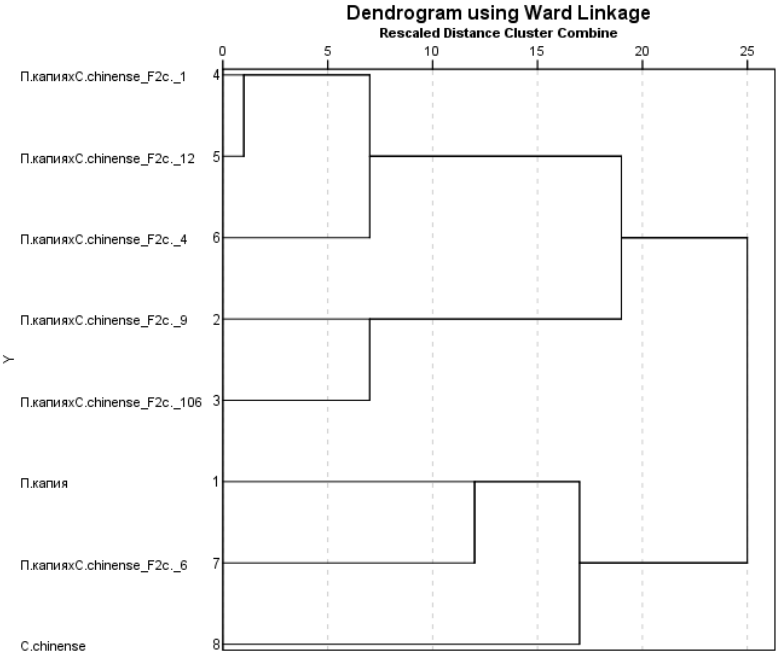
маркера бяха получени общо 65 полиморфни ивици. Ясно бяха отличени фрагменти с размер между 350 до 2000 базови двойки. Средният брой на ивиците, генерирани с полиморфните праймери, е 6 (при максимум 9 за праймер PE8). Средно получените продукти на праймер са 8, а отчетеното ниво на полиморфизъм е 4,4.

Въз основа на генотипното профилиране на родителските форми и F_2 на извършените кръстоски с помощта на ISSR праймерите беше проведен клъстерен анализ. За генериране на дендрограмата беше използвана системата 1/0, като с единица е отбелязано присъствието на ISSR фрагмент, а с нула – отсъствието на амплифициран такъв.

На подклъстерните разделения са представени относителните генетични разстояния между отделните анализирани проби (Фиг. 29). Наблюдава се групиране на родителските линии и F_2 поколението, като е интересно да се отбележи, че *C. annuum L.* – сорт Фамилия и *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро (двете родителски линии в тази кръстоска) се оказват относително отдалечени от F_2 поколението. Този на пръв поглед необичаен факт може да се обясни с получените високи нива на генетично разнообразие в поколението, от което за целите на този анализ бяха подбрани най-отличаващите се индивиди. Видно от представената дендрограма, по отношение на изследваните признаци, е че популацията от F_2 индивиди се отличава дори с по-голяма генетична отдалеченост между индивидите, отколкото е тази между родителските форми. От друга страна групата на F_2 индивидите като цяло се оказва съществено различна от всеки един от двата родителя.



Фигура 29. Клъстериране на родителските форми с индивиди от F_2 от кръстоската Фамилия x *C. chinense* Jacq. въз основа на идентифицираните ISSR полиморфизми.



Фигура 30. Клъстериране на родителските форми с индивиди от F_2 от кръстоската Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. въз основа на идентифицираните ISSR полиморфизми.

На фигура 30 е представена дендрограма с разпределението на родителските генотипове и F_2 от кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. – *тип Хабанеро*. Тук отново се наблюдава значително генетично разнообразие в F_2 поколението като е интересно да се отбележи, че сорт *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия и *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро (двете родителски линии в тази кръстоска) отново се оказват относително по-слабо отдалечени една спрямо друга отколкото от F_2 поколението. Също така е интересен фактът, че един от F_2 индивидите попада в клъстера на родителските форми. Това не е неочакван резултат, тъй като по отношение на поне част от признаците индивидите от F_2 поколението би трябвало да проявяват междинни нива. Самият факт, че при кръстосването на

генетично толкова отдалечени родители, се установява получаването на генетично разнообразие, надхвърлящо преките различия между двата родителя, дава едно от възможните обяснения за наблюдаването в различните географски региони на света значителни различия между култивираните форми пипер. Може да се спекулира, че индуцирането на подобно значително генетично разнообразие в междувидовите кръстоски е било използвано в периода на емпирична селекция на културата за получаването на форми с разнообразни характеристики – от формата, размера и оцветяването на плодовете до разнообразните нива на лютивина в тях. В това отношение настоящият дисертационен труд допринася за разясняване на функциониращите механизми на регулация на нивата на капсаицин, чрез разкриване присъствието и начина на функциониране на наличните в българската селекция алели на гена *AT3*, както и на наличието в поне част от образците на функционални алели на втори, епистатичен ген.

ИЗВОДИ:

На базата на така получените резултати от проведените в настоящия дисертационен труд експерименти и анализи, могат да се направят следните изводи:

1. Чрез приложения молекулярен метод е установен алелният състав на гена *Pun1* в родителските форми пипер, F_1 и F_2.
2. При българските сортове пипер – Пловдивска капия, Фамилия и ИЗК Деликатес, от вида *C. annuum* L., загубата на лютивина се дължи на наличието на най-широко разпространения мутантен рецесивен алел – *pun1-1*. Те са с генотип *pun1*-1/*pun1-1*. При анализираните *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L., доминантният алел *Pun1* е в хомозиготно състояние (*Pun1/Pun1*).
3. Използваната технология за изкуствена хибридизация на пипера е приложена успешно. След извършените органолептични и лабораторни анализи е доказана хибридната природа на F_1. Потвърдено е хетерозиготното състояние на гена *Pun1,* хибридите са с генотип *Pun1/pun1-1*.
4. В F_2 на анализираните кръстоски *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. annuum* L. – сорт Деликатес х *C. frutescens* L. съотношението 3:1 между растенията с лютиви плодове и тези със сладки плодове и съотношението 1:2:1 между растения с генотип *Pun1/Pun1*: *Pun1/pun1-1*: *pun1-1/pun1-1* в F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Деликатес х *C. frutescens* L., още веднъж доказва участието на единичен ген (*Pun1*), контролиращ лютивината на плодовете.
5. Въпреки широкото разпространение на основния алел *Pun1*, неговото наличие в сладкия пипер *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия не е възпрепятствало разпространението на нов ресурс, контролиращ лютивината. В F_2 на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро съотношението 9:7 между растенията с лютиви и сладки плодове, както и разнообразния генотип (както *pun1-1/pun1-1*, така и *Pun1/pun1-1* и *Pun1/Pun1*) на растения със сладки плодове показват, наличието на втори ген, определящ липсата на лютивина при тях.

6. Въз основа на секвениране на част от гена *Pun3* и извършените биоинформатични анализи, върху този фрагмент не са установени мутации предизвикващи блокиране на капсаицин синтеза. Установените мутации в първи и втори екзон на *Pun3* не са свързани с липсата на лютивина при изследваната хибридна популация F_2 *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро.
7. В настоящото проучване ISSR маркерите успешно са използвани за оценка на генетичното разнообразие между анализираните видове и сортове пипер и хибридните популации *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq. и *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро.
8. Получените резултати дават основа за развитие на бъдещи селекционни програми, чрез прилагане на MAS (маркер-асистирана селекция).

ПРИНОСИ

Научно-теоретични приноси:

1. За първи път се определя алелното състояние на гена *Pun1* при българските сортове пипер – Пловдивска капия, Фамилия и ИЗК Деликатес, от вида *C. annuum* L.
2. За първи път се проследява унаследяването на гените и техните мутантни алели, отговорни за липсата на лютивина в F_1 и F_2 при кръстоските *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро, *C. annuum* L. – сорт Фамилия х *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. annuum* L. – сорт ИЗК Деликатес х *C. frutescens* L.
3. Хипотезите, относно унаследяването на лютивината и липсата на лютивина при изследваните пипери, валидирани посредством прилагане статистическият показател $\chi 2$ могат да се използват в бъдещи изследвания и от други автори.
4. За първи път се установява наличието на допълнителен локус с ефект върху капсаицин синтеза при F_2 популация на кръстоската *C. annuum* L. – сорт Пловдивска капия х *C. chinense* Jacq.– тип Хабанеро.
5. За провеждане на молекулярен ISSR анализ при пипера са модифицирани и адаптирани методики прилагани при други култури.

Научно-приложни приноси:

1. За първи път е извършена успешна хибридизация между майчини растения от българските сладките сортове пипер Пловдивска капия, Фамилия и ИЗК Деликатес от вида *C. annuum* L. и лютиви бащини растения от видовете *C. chinense* Jacq. – тип Хабанеро и *C. frutescens* L.
2. Анализираните образци пипер могат да бъдат използвани като потенциален донор в бъдещи селекционни програми.
3. Приложената методика за определяне на алелното състояние на гена *Pun1* е добра стратегия при тестване на партиди семена в програми за чистота и качество.
4. Получените от секвенирането и обработени чрез биоинформационните инструменти данни осигуряват основата, необходима за провеждане на допълнителни анализи на гените, отговорни за синтеза на капсаицин при пипера (род *Capsicum*).

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. Srebcheva, T., & Bojinov, B. (2018). Genetic control of non-pungency in pepper (*Capsicum* sp.)(mini-review). *Ştiinţa Agricolă*, (2), 57-63. https://sa.uasm.md/index.php?journal=sa&page=article&op=view&path%5B%5D=615

2. Srebcheva, T. & Bojinov, B. (2019). Identification of allelic State of the *Pun-1* gene associated with the capsaicin synthesis in selected *Capsicum* (pepper) species. *Научни трудове на Съюза на учените–Пловдив. Серия В: Техника и технологии*, *17*, 257-260. https://cyberleninka.ru/article/n/identification-of-allelic-state-of-the-pun-1-gene-associated-with-the-capsaicin-synthesis-in-selected-capsicum-pepper-species?fbclid=IwAR14xQKa9VRsYEVL2xO5kVW71J2FYHjFyXF6Ta2NqOoN61QBzMUhma565yw

3. Srebcheva, T., & Kostova, M. (2022). Influence of the *Pun1* gene on capsaicin synthesis in hybrid lines of the genus *Capsicum*. *Trakia Journal of Sciences*, *20* (1), 37. DOI:10.15547/tjs.2022.01.005, ISSN 1313-3551 (online).

4. Srebcheva, T., Kostova, M. (2022). Study of the inheritance of pungency in a hybrid pepper lines (genus *Capsicum*). Изследване унаследяването на лютивината в хибридна линия пипер (род *Capsicum*). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans (JMAB)* Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2022, 25 (1), 407-422 ISSN1311-0489 (Print), ISSN 2367-836 (Online).