



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

ГЕОРГИ НИКОЛАЕВ БОНЧЕВ

**Молекулярно- генетична характеристика на мутантни форми тип
sphaerococcum при *Triticum aestivum* L. и *Triticale* с помощта на
транспозони**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Научна специалност: 01.06.06 – Генетика

Научни ръководители:

Проф. д.б.н. Севдалин Георгиев

Доц. д-р Любомир Стоилов

Рецензенти:

Доц. д-р Светлана Ланджева

Доц. д-р Анелия Янчева

София, 2011 г.

Дисертационният труд е написан на 117 страници и включва 22 фигури и 6 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 258 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения Научен съвет на секция „Молекулярна генетика“ към Института по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 07.10.2010 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 29.06.2011 г. От 10.00 ч. в заседателната зала на Института по физиология на растенията и генетика - БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на специализираното научно жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика, БАН, бл. 21, ет. 2, ст. 225.

ГЕОРГИ НИКОЛАЕВ БОНЧЕВ

**Молекулярно-генетична характеристика на мутантни форми тип
sphaerococcum при *Triticum aestivum* L. и *Triticale* с помощта на
транспозони**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Научна специалност: 01.06.06 – Генетика

Научни ръководители:

Проф. д-р дбн Севдалин Георгиев

Доц. д-р Любомир Стоилов

Рецензенти:

Доц. д-р Светлана Ланджева

Доц. д-р Анелия Янчева

София, 2011 г.

Използвани съкращения

б.д. – базови двойки

ЕМС – етилметан сулфонат

кб. – килобаза (1кб=1000 базови двойки)

AFLP – **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism (полиморфизъм по дължината на амплифицираните фрагменти)

BARE-1 – **B**arley **R**etrotransposon

CTAB – hexadecyltrimethyl-ammonium bromide

FISH – **F**luorescence **I**n **S**itu **H**ybridization (флуоресцентна in situ хибридизация)

INT – Integrase (кодираща област на ретротранспозона)

RT – Reverse Transcriptase (кодираща област на ретротранспозона)

IRAP – **I**nter **R**etrotransposon **A**mplified **P**olymorphism (междуретротранспозонов амплификационен полиморфизъм)

PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction (полимеразна верижна реакция)

RAPD – **R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**na (произволно намножена полиморфна ДНК)

REMAP – **R**etrotransposon **M**icrosatellite **A**mplified **P**olymorphism (ретротранспозон-микросателитен амплификационен полиморфизъм)

SSAP – **S**equence **S**pecific **A**mplified **P**olymorphism (секвенционно специфичен амплификационен полиморфизъм)

SSR – **S**imple **S**equence **R**epeats (прости повторени последователности)

TE – транспозонен елемент

TIR – **T**erminal **I**nverted **R**epeat (краен обърнат повтор)

WIS 2-1A – **W**heat **I**nsertion **S**equence

I. УВОД

В еволюционен аспект процесите на развитие и динамика на геномите при про - и еукариотните организми са тясно свързани с включването, пренареждането и изменението на съществуващите нуклеотидни последователности. Активна роля в тези процеси играят подвижните генетични елементи или транспозони, заемащи основната част от геномите в частност на житните растения, достигаща до приблизително 70% при растителни видове като царевица, ечемик и пшеница. Дълго време се е считало, че транспозоните представляват „егоистична“, паразитна ДНК, но понастоящем е установено и всеобщо прието, че транспозоните представляват динамична биологична система, основен източник на генетична вариабилност и фактор, играещ важна роля в процеса на еволюцията на геномите. Като се има предвид потенциалното еволюционно значение на транспозоните, то факторите контролиращи тяхната динамика в естествени и в условия на стрес популации имат важно значение за геномната еволюция. Понастоящем са малко данните относно природата на тези фактори и ефекта на транспозоните върху геномната стабилност. Съществено влияние върху динамиката на транспозоните в генома гостоприемник оказват различни биотични и абиотични стресови фактори на околната среда. Активирането и преместването на транспозоните може да доведе до различни генетични промени като мутации, променящи експресията на засегнатите гени и хромозомни нарушения от типа на транслокации, инверсии, делеции и др. Тези събития създават структурен и функционален инсерционен полиморфизъм между отделните индивиди и определят подвижните генетични елементи като удобна и ефективна система за молекулярно генетичен анализ на еукариотния геном. Прилагането на редица съвременни молекулярни маркерни методи, базирани на ретротранспозони, като IRAP, REMAP, SSAP позволява изясняването на важни аспекти на съвременната генетика и геномика - между- и вътревидово генетично разнообразие, филогенетика, картиране и манипулиране на гени. Болшинството от изследванията върху подвижните генетични елементи се провеждат върху естествени растителни популации. В този аспект използването на колекции от мутантни форми предоставя нов подход за изучаване на процесите, отговорни за динамиката и регулацията на транспозонната активност в отговор на стресови фактори на околната среда, както и влиянието на подвижните генетични елементи върху експресията на определени гени.

Пшеницата представлява важен растителен обект за молекулярно генетичен анализ, насочен към функционалното и структурно изучаване на нейния геном, еволюционно развитие и формиране на стратегии за неговото манипулиране. Индуцирането на голям брой мутации, които засягат гени в отделните геноми на *T. aestivum* е от особено значение за изучаване на структурната и функционална организация на генома на житните. Сред тези мутации съществено важно място заемат мутации, засягащи определени признаци и водещи до възникването на таксономични видове като *compactum*, *sphaerococcum* и *spelta*. Този вид мутации имат важно значение за проучване систематиката на пшеницата.

Изследванията, представени в настоящия дисертационен труд, са насочени към молекулярно-генетичното и цитогенетичното характеризирание на сферококумни мутантни форми при хексаплоидните пшеница и *Triticale*, получени чрез третиране с етил метансулфонат (EMS). Предполага се, че подвижните генетични елементи имат определена роля в наблюдаваното фенотипно и генотипно разнообразие, като определен интерес представлява връзката между стрес и функционална и структурна динамика на подвижните генетични елементи и тяхното влияние върху експресията на мутантния фенотип. В изследванията бяха включени две от най-характерните и широко изучавани семейства транспозони при растенията: Ac/Ds транспозони; и BARE-1 и WIS 2-1A ретротранспозони. Известно е, че и двете семейства са широко представени в генома на житните и в частност в анализираните мутантни форми тип *sphaerococcum*, но досега не е правена по-детайлна структурна и функционална характеристика на тези елементи.

Основните аспекти, които засяга този дисертационен труд, могат да допринесат за по-детайлното вникване в същността на такъв важен генетичен проблем като нестабилността на пшеничния геном, както и в сложната природа на мутацията тип *sphaerococcum*.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящата дисертация се състои в молекулярно-генетичната характеристика на EMC-индуцирани мутантни форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* L. и *Triticale* MT 47 с помощта на подвижни генетични елементи Ac/Ds и BARE-1/WIS 2-1A.

За реализиране на посочената цел бяха поставени следните експериментални задачи:

- 1) Локализиране на гените, обуславящи *sphaerococcum* мутацията при мутантни форми на *T. aestivum* L.
- 2) Идентифициране и анализ на структурата и функцията на Ac-транспозон подобните последователности в генома на мутантните линии пшеница и *Triticale* посредством:
 - а) Изолиране и идентификация на Ac-подобни последователности чрез PCR амплификация.
 - б) Анализ на профила на метилиране на Ac-подобните последователности.
 - в) Идентифициране на Ac хомоложни последователности в мутантни форми пшеница с помощта на флуоресцентна *in situ* хибридизация.
- 3) Проучване на полиморфизма на мутантните форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* и 6х *Triticale* чрез прилагане на генетични молекулярни маркери, базирани на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A.
- 4) Транскрипционен профил на BARE-1/ WIS 2-1A ретротранспозони в мутантни форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* и 6х *Triticale*.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

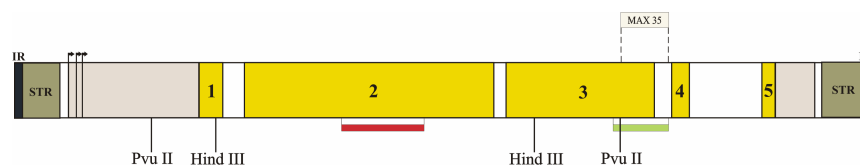
Като експериментален материал в настоящия дисертационен труд бяха използвани мутантни форми тип *sphaerococcum*, получени след третиране с химичния мутаген етилметансулфонат (ЕМС) на контролния сорт *T. aestivum* Садовска ранозрейка-2 и *Triticale* сорт MT47 Armadillo с геномен състав AABBRR/2D/2R (Фиг.1) Според стабилността в проявата на мутантния фенотип мутантните форми се разделят на две основни групи: 1) форми, проявяващи нестабилен вариабелен фенотип, които изцяло или частично ревертират към дивия фенотип (*aestivum*) - 613 sph, 6512 sph, 49L; и 2) мутантни форми със стабилен сферококумен фенотип: 49 compactum, 49L/13, 2Kx613 и MT47sph.



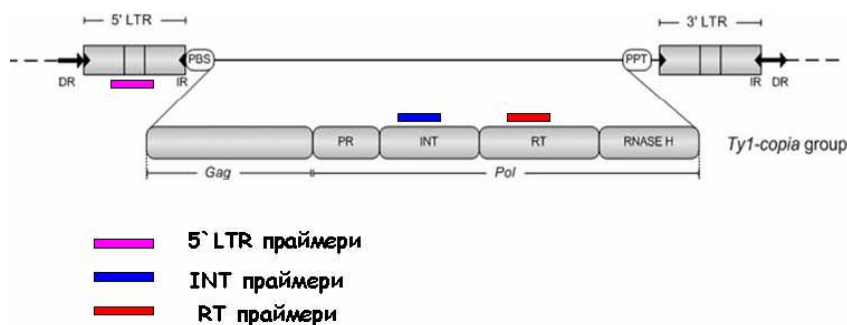
Фиг. 1 Мутантни форми тип *sphaerococcum* на *T. aestivum* var. Садовска ранозрейка- 2 и *Triticale* MT47 - MT47 sph (1), MT47 контр.(2), Садовска ранозрейка-2 (3), 49L (4), 613 aest (5), 613 sph (6), 613 межд. клас (7), 613 sph хомозиготи (8), 6512 aest (9), 6512 sph (10), 2Kx613 spelta (11), 49 compactum (12), 49L/13 (13)

Мутантните линии 613 sph и 6512 sph представляват оригиналните мутантни линии. Формите 613 aest и 6512 aest представляват ревертантни мутанти тип *aestivum*, получени при разпадането на съответните изходни форми 613sph и 6512sph. Мутантните линии 49L sph, 49 compactum и 2kx613 са производни на изходните форми 613 и 6512 след кръстоските им със сорт Садовска ранозрейка - 2. Предходни цитологични наблюдения показваха наличието на структурни промени от типа на реципрочни транслокации, квадриваленти, хромозомни и хроматидни мостове и хромозомни изоставания в мутантните форми 613 sph, 6512 sph, 49L sph, 49 L aest, както и мутантната форма MT 47 sph (Georgiev 2004). Подобен род признаци са отличителни за действието на подвижни генетични елементи или транспозони. Предполага се, че подвижните генетични елементи имат определена роля в наблюдаваното фенотипно и генотипно разнообразие, което и даде предпоставка за провеждането на обстоен молекулярно- генетичен и цитогенетичен анализ на тяхната структурна и функционална динамика

Анализирани транспозони –транспозонни последователности, хомоложни на царевичния Ac9 елемент (Фиг. 2); BARE-1 и WIS 2-1A ретротранспозони (Фиг. 3).



Фиг. 2 Структура и частична рестрикционна карта на царевичния Ac9 елемент. Показани са областите, намножени с праймерните двойки ПР1/ПР 2 (в червено) и ПР3/ПР4 (в зелено).



Фиг. 3 Типична структура на Ty-1 copia ретротранспозон. В различен цвят са показани ретротранспозонни области, спрямо които се анализира експресията на ретротранспозона WIS 2-1A.

2. Методи

а) Геномна ДНК беше изолирана или чрез СТАВ метода (базиран на *Murray and Thompson, 1980*) или с помощта на *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen Inc, Valencia, CA 91355).

б) За локализация на гените, обуславящи мутантния фенотип тип *sphaerococcum*, беше използван монозомен анализ с помощта на вспомогателната монозомна серия на Chinese Spring.

в) За характеризиране на геномното разпространение и профила на метилиране на Ac-подобните последователности в анализирани мутантни форми бяха приложени:

- PCR базиран подход с праймерни последователности към различни участъци на Ac-елементите.

- рестрикционен и ДНК хибридикационен анализ. Този анализ включваше смилане на геномни ДНК с рестриктази Hind III, EcoRI, PvuII, както и с чувствителните към метилиране HpaII и MspI, и последващото им хибридиране с пшенична Ac-хомоложна ДНК сонда.

г) За идентифицирането на Ac- подобните транспозонни елементи на хромозомно ниво беше използвана флуоресцентна *in situ* хибридикация (FISH).

д) За оценка на генетичния полиморфизъм на мутантните форми пшеница и *Triticale* бяха използвани молекулярно-генетични методи, основани на ретротранспозони - SSAP, IRAP, REMAP. За тази цел бяха използвани две от най-широко разпространени семейства ретранспозони при растенията- BARE-1 и WIS 2-1A.

е) Генетичното родство беше изчислено чрез neighbor-joining подхода (*Saitou and Nei 1987*) с програма NTSYSps 2.11 и коефициента на Nei и Li (*Nei and Li 1979*). Статистическият анализ се състоеше в генериране на бинарен матрикс, като присъствието и отсъствието на ДНК ивици е забелязано като 1 или 0 съответно и третирано като дискретен признак. ДНК фрагменти с еднакво един спрямо друг разположение се смятат за идентични.

ж) Клониране и трансформация

При REMAP и IRAP методите, както и при намножаването на Ac-хомоложни последователности, пречистените ДНК фрагменти бяха клонирани с помощта на *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Fermentas) и трансформирани с *TransformAid™ Bacterial Transformation Kit* (Fermentas).

При SSAP метода изолираните ДНК фрагменти бяха клонирани в pCR®2.1-TOPO vector и трансформирани в компетентни клетки на *E.coli* според ръководството на производителя (*TOPO TA Cloning® Kit*, Invitrogen).

з) За оценка на функционалната активност на WIS 2-1A ретротранспозона беше приложен полуколичествен RT-PCR анализ, включващ изолиране на тотална РНК с *TRIzol*, синтез на кДНК с *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* и oligo(dT)₁₈ олигонуклеотидни праймерни последователности съгласно ръководството на

производителя (Fermentas); и PCR намножаване с праймери към различни кодиращи области на ретротранспозона WIS 2-1A (Фиг. 3).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Локализация на гените, обуславящи сферококумен фенотип при мутантни форми пшеница *T. aestivum*

Получените мутантни форми тип *sphaerococcum* в *T. monococcum*, *T. durum*, и 6х *Triticale* MT47 (Georgiev 1979, 1980, 1982), притежаващи в състава си само А и В геномите, ни дават основание да считаме, че *sphaerococcum* ефекта се обуславя от друг ген или гени, чиято локализация е извън D генома (Sears 1947, Rao 1977), най-вероятно в А и/или В геномите.

При нашите изследвания мутантните форми 613 и 6512 се характеризират като хетерозиготни структурни мутантни форми по дадена транслокация, които перманентно разпадат на растения тип *aestivum*, *sphaerococcum* /хетерозиготни/ и *sphaerococcum* /хомозиготни/ в съотношение 1:2:1 т.е., те са с доминантен характер на унаследяване. С цел локализиране на гени с доминантен тип на унаследяване се наложи отглеждането на F2 поколение. Всичките F1 растения бяха самоопрашени. От 70 до 370 F2 растения от всяка една кръстоска на мутантните линии с монозомната серия се събираха отделно и бяха използвани в цитологичния анализ. Тъй като резултатите от сегрегацията на растенията от F2 в кръстоските по 3А, 3В се отклоняваха от очакваното съотношение 3:1 в полза на растенията показващи *sphaerococcum* фенотип, ние фокусирахме вниманието си при провеждането на цитологичния анализ само върху трите линии 3А и 3В.

В Табл. 1 са представени обобщените резултати от генетичния анализ на 3А, 3В и 3D линии във F2 популации на сомоопрашените F1 хибриди /показващи хромозомна конфигурация от 20 II + 1 I в MI на мейозиса/.

Табл. 1 Монозомен генетичен анализ на мутанти тип *sphaerococcum* в *T. aestivum*

F2 популация	Брой растения	Наблюдавано съотношение		χ^2	P
		<i>sphaerococcum</i>	<i>aestivum</i>		
				(3:1)	
Моно 3А х 6512	104	54	50	29.5	<0.01
Моно 3В х 613	46	23	23	15.3	<0.01
Моно 3D х 613	59	47	12	0.68	0.50-0.20
Моно 3D х 6512	64	52	12	0.29	0.50-0.20

В популацията от F2 на монозомните растения по 3А и 3В хромозоми, сред притежаващи нормалния фенотип (*aestivum*), при кръстоската по монозомната 3А линия само две растения бяха с 40 хромозоми, а при кръстоската по 3В монозомна линия - само едно растение т.е. те са нулизомици. Същевременно във F2 при тези линии се наблюдаваше драстично отклонение от очакваното разпадане 3:1 на растения тип *sphaerococcum*: растения с фенотип *aestivum*. В този случай стойностите на χ са 29.5 и 15.3, където $P < 0.01$. Тези резултати ни дават основание да считаме, че гена Sp3 обуславящ *sphaerococcum* ефекта при мутантната форма 6512 е локализиран в 3А хромозома, а гена Sp2 при 613- в 3В хромозома. Тези резултати са още едно доказателство, получени при нашите изследвания за наличието на други гени- S2 и S3, локализирани в А и В геномите, освен този/ S1/, локализиран от Sears в 3D хромозома.

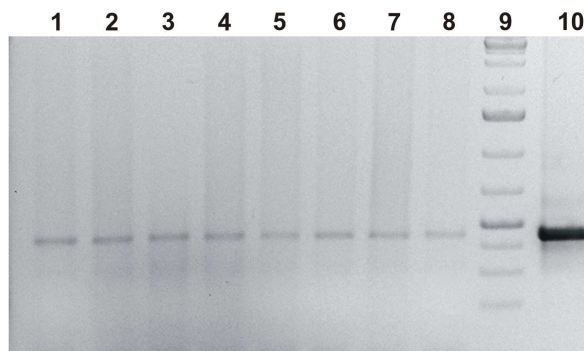
2. Присъствие, структурна и функционална характеристика на Ас-транспозон подобните последователности в генома на мутантни линии тип *sphaerococcum*

Изолиране и идентификация на Ас-подобни последователности чрез PCR.

Беше използван PCR-базиран подход за детектиране, изолиране и характеризиране на ДНК последователности, хомоложни на царевичния Ас елемент при анализирани мутантни линии тип *sphaerococcum* на *T. aestivum* и *Triticale*, както и на други представители от житните, като *T. monococcum*, *H. vulgare* и *Z. mais*. Бяха използвани две двойки праймери, съответстващи на различни участъци на транспозазната област на царевичния Ас9 елемент: едната праймерна двойка (ПР 1 и ПР2) намножава централен участък от екзон 2 (в червено), а другата двойка (ПР 3 и ПР4) - областта, обхващаща екзон 3 и съседния интрон и конструирана на базата на ечемична Ас- подобна последователност МАХ 35 (в зелено)(Фиг. 2).

PCR подходът с комбинация от праймери ПР 1 и ПР 2 позволи намножаването на единичен фрагмент с дължина 458 б.д. от тотална геномна ДНК на мутантни форми тип *sphaerococcum* на *T. aestivum*, *Triticale* MT47, *T. monococcum* и *H. vulgare* (Фиг. 4). Бяха изолирани ДНК фрагменти от Садовска ранозрейка-2, мутантна линия 613sph, *T. monococcum* и *H. vulgare*. Секвенционният анализ на тези фрагменти показва, че те притежават почти

пълно сходство един спрямо друг, с изключение на единични нуклеотидни разлики (Фиг. 5). При сравнение с съответната царевична Ас транспозазна последователност с дължина 454 б.д. бе установено 57% сходство (данните не са представени). Приложеният BLAST анализ на тези секвенции в база данни на житните TREP (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml>) показва наличието на хомоложни последователности при ВАС клонове на *T. urartu* (DQ267106) и *T. turgidum* (DQ267105) във област, богата на транспозони на 4А хромозома (Dvorak et al 2006).



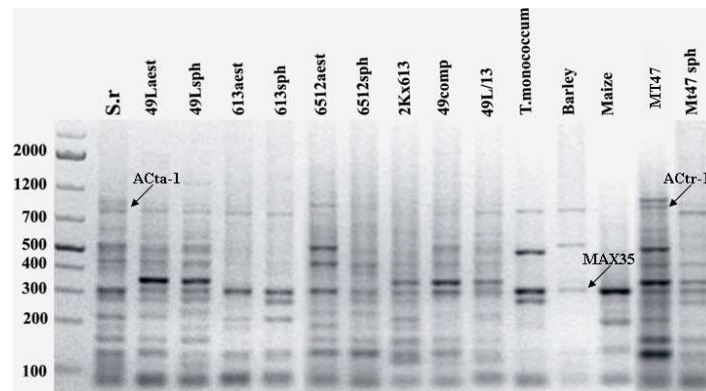
Фиг. 4 PCR продукти, амплифицирани при мутантни форми тип *sphaerosocum*, *T. monosocum* и pAc9 с праймери ПР 1 и ПР 2: *T. aestivum*(1), 613sph (2), 613aest (3), 6512sph (4), 6512aest (5), Triticale MT47 (6), Triticale MT47sph (7), *T. monosocum* (8), молекулан маркер GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus(Fermentas), 9, плазмид pAc9(10).

При сравняването на нуклеотидната последователност на изолираните транспозонни последователности с тези от ВАС клоновете спомощта на програмата Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, Corpet 1988) беше установено, че те притежават 86% сходство в 4 добре обособени участъка (Фиг. 5). Както се вижда от фигурата, делеции в Ас- транспозазните последователности са възникнали при ечемика, *T. monosocum*, мутантната форма 613 sph и нейната контролна форма в сравнение с *T. urartu* и *T. turgidum*.



Фиг. 5 Сравнителен секвенционен анализ на Ас-хомоложни фрагменти, генерирани с праймери PR 1 и PR2 при различни представители на род *Triticum* и *Hordeum*, със съответните последователности от ВАС клоновете на *T. urartu* и *T. turgidum*.

Комбинацията от праймери ПР 3 и ПР 4 генерира значително по-сложен амплификационен профил с по-голям брой фрагменти за разлика от този, получен посредством праймери ПР 1 и ПР 2 (Фиг. 6). Наблюдава се полиморфизъм както между отделните мутантни форми, така и спрямо контролните линии, визуализиран като поява или загуба на ДНК фрагменти. Всяка една от линиите притежаваше собствен специфичен амплификационен профил, въпреки наличието на множество общи за всички линии фрагменти, което позволява ефективно разграничаването на отделните мутантни форми. Така например, деривативните мутантни форми 49L aest, 49Lsph, 2Kx613, 49 compactum и 49L/13 притежават общ профил, различен от този на изходните форми 613 sph и 6512 sph. Това свидетелства за наличието на специфично модулиране на геномно ниво на Ас транспозонната активност.



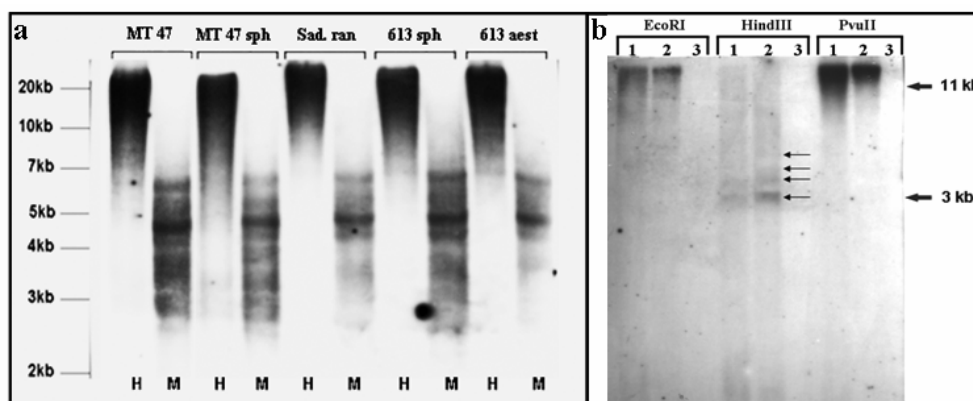
Фиг. 6 Амплификационен профил на Ас - хомоложните ДНК последователности при мутантни форми на *T. aestivum* и *Triticale*, както и при други житни геноми, генерирани с праймери ПР 3 и ПР 4. Със стрелки са обозначени новоизолираните клоновете ACta-1, ACtr-1 и оригиналният ечемичен Ас подобен фрагмент MAX35.

Две Ас-подобни последователности бяха изолирани от контролните форми Садовска ранозрейка-2 (клон ACta-1 – 761 бд) и *Triticale* MT 47 (клон ACtr-1 762 бд). След проведения BLAST анализ се установи, че те са хомоложни на съществуващите клонове ACas-1 (при *Ae. speltoides*) и ACtu-1 (при *T. urartu*) (Altincut et al 2006). Интерес представлява по-големия брой намножени Ас-подобни елементи в хексаплоидните форми в сравнение с диплоидните *T. monococcum*, *H. vulgare* и *Z. mays*. Това най-вероятно се дължи на наличието на по-голяма популация на различни видове Ас-подобни елементи, становище, изразено по рано от Altincut et al. 2006. Получените резултати свидетелстват за възникването на структурни преустройства и възможна активност на Ас-подобни елементи в популацията на анализирани мутантни линии в резултат на третирането с EMS. Беше установена също така и корелативна връзка между копийност на Ас елементите и увеличаване размера на генома. Установената вариабилност на Ас-подобните елементи би могла да се използва за разработване на подходящи молекулярни маркери за генотипиране при житните и оценка на влиянието на различни абиотични фактори върху геномната стабилност.

Геномно разпространение и профил на метилиране на Ас-подобните последователности

Беше анализирано геномното разпространение и в частност профила на метилиране на Ас-подобните последователности в мутантните линии тип *sphaerococcum* при *T. aestivum* и *Triticale* и съответните им контролни форми. Редица изследвания показаха, че активността на повечето растителни гени, в това число и на транспозоните е пряко свързана със степента на тяхното метилиране. В този аспект интерес представляваше установяване на зависимост между профила на метилиране на Ас-подобните последователности и проявата на сферококумния фенотип. Като сонда при хибридизациите беше използвана Ас-хомоложната последователност, изолирана от контролната форма Садовска ранозрейка-2 с помощта на праймери ПР1 и ПР 2.

Най-интересното наблюдение при получените хибридизационните профили на геномни ДНК от контролните форми Садовска ранозрейка-2, MT47 *Triticale*, както и *Z.mays*, смлени с рестриктази EcoRI, HindIII и PvuII, е че тази ДНК последователност не беше детектирана в царевичния геном (Фиг.7б). Това вероятно отразява нейното отсъствие или ниска степен на хомология с царевичния Ас9 елемент. И в двата случая може да се говори за Ас-хомоложна последователност, която е специфична за пшеничния геном. Генерирани хибридизационни профили бяха практически идентични, което свидетелства за присъствието на транспозазната последователност в геномите на анализирани форми пшеница и *Triticale*, както и сходната геномна организация на ДНК участъците, съдържащи хибридизационната проба. По-интензивният хибридизационен сигнал и наличието на допълнителни ивици при *Triticale* в сравнение с пшеничния геном би могло да отразява относително по-високата копийност на Ас-подобните последователности при *Triticale*. При метилационния анализ бяха наблюдавани различия между пшеничните форми и тези на *Triticale*, изразяващи се в присъствието на по-голям брой на MspI-генерирани фрагменти при *Triticale* (Фиг. 7а). Ние считаме, че най-вероятно това може да се дължи на геномни различия, по-високата копийност и структурна дивергенция Ас-хомоложните последователности в този геном. Тази хипотеза се подкрепя и от данните от Hind III профила (Фиг.7б).

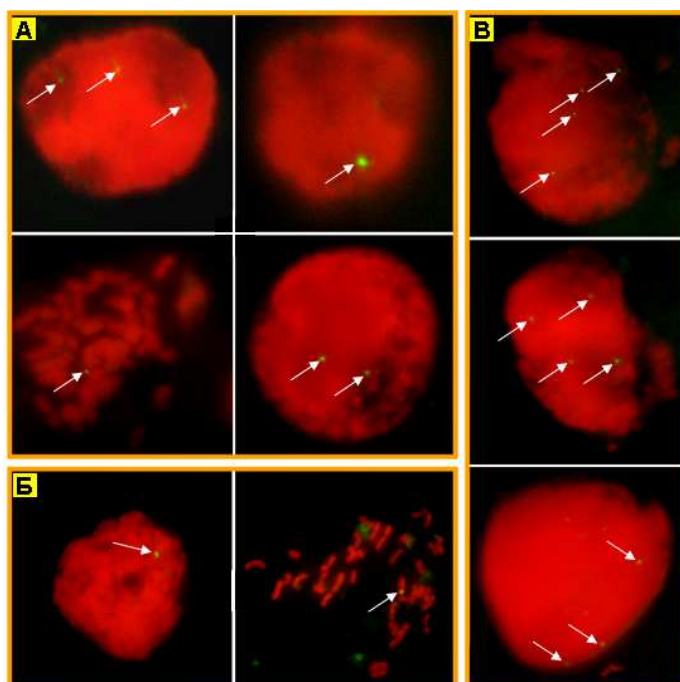


Фиг. 7 Геномен профил на Ас-хомоложните последователности в мутантни форми тип *sphaerococcum*, получен чрез метилационен анализ с HpaII (H) и MspI (M) (панел а), и смилане на геномни ДНК на *T. aestivum*(1), *Triticale* (2) and царевица (3) с EcoRI, HindIII и PvuII (панел б).

Видими отклонения се наблюдават в хибридационния профил (наличието на полиморфни фрагменти) между контролната и мутантната форма на *Triticale* за разлика от мономорфния профил при пшеничните форми. Отсъствието на изявен полиморфизъм при пшеничните линии не означава дефинитивна липса на промени в профила на метилиране на Ас-хомоложните последователности. Такива промени могат да възникнат в близко разположени потенциално активни рестрикционни места, които не могат да бъдат детектирани с резолюцията, позволявана от хибридационния анализ. В действителност такова е положението при Ас елементите при царевицата, където местата, чувствителни към метилиране, са групирани близко едни до други изключително в крайните промоторни и регулаторни области. По-акуратна и достоверна методология би могла би могла да бъде използването на PCR базирани методи за анализ на степента на метилиране в определени локуси на транспозоните. Такъв подход за анализ на степента на метилиране на крайните области на Ас-подобните транспозонни последователности е невъзможен на този етап, поради това, че те все още не са изолирани цели Ас-подобни транспозони при пшеницата.

Идентифициране на Ас хомоложни последователности в мутантни форми пшеница с помощта на флуоресцентна *in situ* хибридизация.

Целта на този анализ беше да се визуализира присъствието на Ас - подобните последователности на ниво хромозоми и интерфазни ядра в геномите на мутантните пшенични форми тип *sphaerococcum*. Това би ни дало информация относно тяхната копийност и евентуално хромозомната им локализация. За тази цел бяха анализирани оригиналните структурни мутантни форми 613 sph и 6512 sph, които се характеризират с ясно изразена хетерозиготност по отношение на проявата на мутантния *sphaerococcum* фенотип.



Фиг. 8 Детекция на Ас-хомоложни последователности чрез FISH при мутантните форми тип *sphaerococcum* 613sph (А и Б) и 6512 sph (В). Хибридизациите на панели А и В са проведени със царевична сонда- Ас9 Pvu II фрагмент , а на панел Б- с пшенична сонда.

За FISH бяха използвани два типа ДНК сонди: а/ Pvu II фрагмент, изолиран от плазмидния конструктор pAc9, съдържащ царевичния елемент Ас9 и б/ Ас хомоложен фрагмент, изолиран от пшеница Садовска ранозрейка 2 с праймери ПР1 и ПР2. И двата фрагмента съответстват на централната транспозазна област на царевичния Ас елемент и взаимно се припокриват (вж. Фиг. 2). Резултатите от проведените *in situ* хибридизациите са представени на Фиг. 8. Както се вижда и при двете мутантни форми 613 sph и 6512 sph се наблюдават хибридизационни сигнали, както на ниво интерфазни ядра, така и на метафазни хромозоми. Тези резултати се явяват в подкрепа на получените от нас данни от ДНК хибридизациите и PCR анализите относно присъствието на Ас-хомоложни последователности в геномите на тези линии. При линия 613 sph, с използването на Pvu II фрагмента от транспозона Ас9 като хибридизационна проба, беше детектиран предимно един сигнал (Фиг.8, панел А), но се наблюдаваха и клетки с два и три сигнала. При използване на пшеничната сонда се наблюдаваха клетки предимно с един сигнал (Фиг. 8, панел Б). Трябва да се отбележи, че отделни клетки се различаваха не само по броя, но и по интензивността на FISH сигналите. Тези данни ни дават основание да предположим, че визуализираните сигнали представляват клъстери (групи от Ас-хомоложни последователности). Разликите в интензитета на тези сигнали вероятно се дължат на различната копийност на Ас-хомоложните последователности в тези клъстери. Възможна е също така и неефективна детекция (неефективна хибридизацията) поради ниската копийност на анализираните области на Ас хомоложните последователности или загуба на копия при транспозиция.

Тези данни ни дават основание да предположим, че визуализираните сигнали представляват клъстери (групи от Ас-хомоложни последователности). Разликите в интензитета на тези сигнали вероятно се дължат на различната копийност на Ас-хомоложните последователности в тези клъстери. Възможна е също така и неефективна детекция (неефективна хибридизацията) поради ниската копийност на анализираните области на Ас хомоложните последователности или загуба на копия при транспозиция. По-слабите сигнали биха могли да се дължат също така на пропадаващо присъствие на неавтономни елементи с делеции в централната транспозазна област. За разлика от 613sph, броят на FISH сигналите в интерфазните клетки при мутантната форма 6512 sph варираше от четири до пет, а в някои случаи и повече от пет (Фиг.8, панел В), което свидетелства за генотипните различия между двете мутантни форми по отношение на Ас-подобните елементи. В подкрепа на това се явяват данните от проучванията на мутантните форми с биохимични (резервните протеини и изоензими) и ДНК молекулярни маркери (AFLP, SSR) (Josifovska et al. 2010)

Проучваните от нас линии 613 sph и 6512 sph представляват хетерозиготни структурни мутантни форми, перманентно разпадащи на растения с различен фено- и генотипен състав (хомо-, хетерозиготни *sphaerococcum* и тип *aestivum*; Georgiev 2004). Поради това на клетъчно ниво е твърде вероятно присъстващите клъстери от Ас подобни елементи в отделните генотипове на мутантните форми (интерфазни ядра и метафазни клетки) да бъдат в хомо- и хетерозиготно състояние или да липсват в отделните генотипове. Това ни дава основание да считаме, че генотиповете на мутантните форми притежават вероятно различен профил по отношение на разпространението и активността на Ас подобните елементи.

Една от задачите на бъдещите изследвания ще бъде свързана с прецизното хромозомно локализиране и картиране на транспозонните елементи в генома на анализираните мутантни форми пшеница.

3. Проучване на полиморфизма на мутантните форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* и 6X *Triticale* чрез прилагане на генетични молекулярни маркери, базирани на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A.

В настоящия дисертационен труд бяха приложени високоспецифични и прецизни молекулярни маркерни системи SSAP, IRAP и REMAP, базирани на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A, за оценка на генетичното разнообразие в мутантни форми тип *sphaerococcum* при 6х видове пшеница и *Triticale*. Съществуват осъдени данни относно приложението на ретротранспозонните молекулярни маркери за оценка на влиянието на стресови фактори на околната среда върху динамиката на пшеничния геном и в частност на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A.

SSAP

Оптимизиране на SSAP профилите

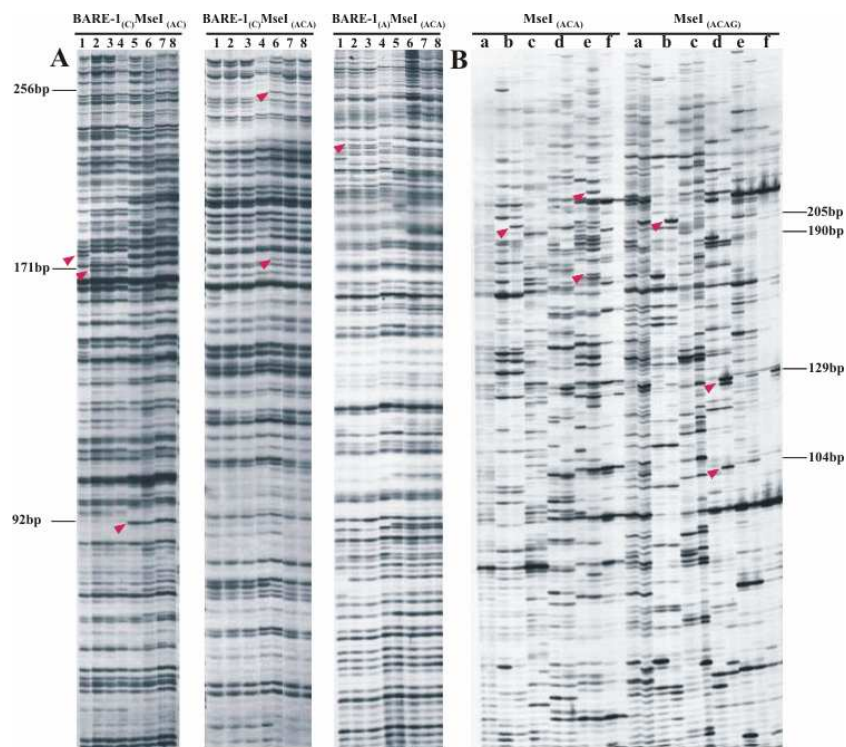
В редица изследвания (Queen et al. 2004, Tam et al. 2005) е установено, че SSAP методът отчита по високи нива на полиморфизъм в сравнение с AFLP и SSR методите и изисква по-малко време и усилия за създаването на желан брой маркери. Приложението на SSAP метода при видове с големи геноми и висока копийност на ретротранспозоните води до амплификация на голям брой продукти (маркери). Като резултат се наблюдава комплексен електрофоретичен профил и трудно разграничаване на отделните фрагменти, което затруднява обработката на получените данни. От съществено значение е оптимизирането на експерименталните условия с цел получаване на полиморфни и едновременно с това представителни и четими ДНК профили. За тази цел е необходимо да се намали броя на намножените PCR фрагменти, което може да се

постигне чрез вариране на броя селективни нуклеотиди, добавени към 3' края на праймерите. Всеки добавен нуклеотид намалява броя на фрагментите с порядък 4^n (n =брой селективни нуклеотиди).

В настоящия дисертационен труд бяха тествани различни BARE-1 и MseI праймерни комбинации с и без добавяне на селективни нуклеотиди към 3' края на праймерите (C, G, T, A, AC, GC, ACA или ACAG).

На Фиг. 9 са представени SSAP профилите на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A при мутантните форми тип *sphaerosoccut* на 6х *T. aestivum* (Фиг. 9А) и 6х *Triticale* MT47 (Фигура 8Б). Представени са най-четливите и същевременно полиморфни и информативни ДНК профили, както и праймерните комбинации, използвани за тяхното получаване.

Резултатите показаха, че картината на SSAP профилите зависи в по-голяма степен от добавянето на селективни нуклеотиди към MseI, отколкото към BARE-1 праймерите.



Фиг. 9 SSAP профили на мутантни форми тип *sphaerosoccut* при *T. aestivum* (А) и *Triticale* (Б) получени с BARE-1 ретротранспозонови праймери (B) и MseI праймери (M). Линиите от 1 до 8 съответстват на мутантните форми както следва: *T. aestivum* var. Садовска ранозрейка 2 (контрола), 613sph, 613aest, 613sph interm, 49Lsph, 49Laest, 49 compactum, 49L/13. В част Б буквите a,b,c,d,e,f съответстват на комбинации *Triticale* MT47 control/ *Triticale* MT47 sph с различни използвани BARE-1 праймери, както следва: a-B(0), b-B(C), c-B(T), d-B(A), e-B(G), f-B(GC). Полиморфните фрагменти са изобразени чрез червени триъгълници.

Идентифициране на полиморфни BARE-1/WIS 2-1A фрагменти

Обобщените данни, относно степента на полиморфизъм на мутантните форми спрямо контролните при различни SSAP профили са представени в Табл. 2.

Табл. 2 Нива на полиморфизъм, наблюдавани при избрани SSAP профили на мутантни форми тип *sphaerosoccut* при 6х пшеница и *Triticale*. При *Triticale* степента на общия полиморфизъм (от всички праймерни комбинации) беше 12,3 %, а при пшеничните форми- 9,3 %. Беше установено, че около половината от полиморфните маркери представляваха нови фрагменти и потенциално нови ретротранспозонови инсерции. Два от маркерите се оказаха, че са специфични за мутантна група 613 (613 aest, 613sph, 613 межд. клас) и три-за деривативните форми 49Laest, 49L/13 and 49compactum. Тъй като ретротранспозонните маркери представляват ДНК фрагменти, разположени непосредствено до ретротранспозоновите копия, то изолирането и секвенирането на полиморфни ДНК фрагменти биха дали информация за техния профил на интегриране, т.е областите, по които се наблюдава полиморфизъм.

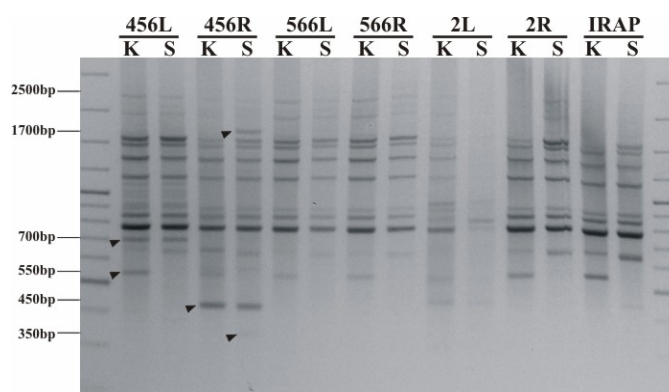
Праймерни комбинаци		Брой ивици	Полиморфни ивици	Нови ивици	Общ полиморфизъм %
T. aestivum					
B(C)M(AC)		95	13	8	13,7 %
B(C)M(ACA)		80	6	4	7,5 %
B(A)M(ACA)		103	7	5	6,8 %
					Σ = 9,3
6x Triticale					
M(ACA)	B(C)	91	16	5	17,6 %
	B(T)	88	7	5	8%
	B(A)	80	9	4	11,3 %
	B(G)	82	11	8	13,4 %
M(ACAG)	B(O)	106	14	6	13,2 %
	B(C)	91	9	4	9,9 %
	B(T)	106	10	6	10,6 %
	B(A)	77	9	6	11,7 %
	B(G)	105	14	8	13,3 %
	B(GC)	58	8	5	13,8 %
Σ=12,3					

Това наложи провеждането на секвенционен анализ на полиморфни фрагменти при мутантните форми на *T. aestivum* при MT 47 *Triticale* и сравняването им със съществуващи хомоложни последователности в TREP база данни (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/>). Бяха секвенирани 6 полиморфни фрагмента при пшеницата и 8 при *Triticale*. Секвенционният анализ показва, че два от полиморфните ДНК фрагмента са сходни със гените за резервните протеини: HMW-глутениновия locus и гама глиадиновия ген при пшеницата. Тъй като елемента WIS 2-1A е изолиран първоначално като инсерция в глутениновия ген (Harbert et al 1987), вероятно тези гени представляват „горещи точки“ за интегриране на ретротранспозонови копия на WIS 2-1A. Детектираните нови BARE-1/ WIS 2-1A инсерции в глутениновия и гама-глиядиновия гени ни дават основание да предположим наличието на динамика на тези ретротранспозони, засягаща структурата и вероятно функцията на тези локуси.

Четири полиморфни маркера представляваха BARE-1 инсерции в други транспозонни последователности: САСТА ДНК транспозони Angela и Caspar, Wilma ретротранспозон (при *Triticale*), както и в Barbara и Sukkula ретротранспозони (при пшеничните мутанти). Тези резултати потвърждават данните от предходни изследвания относно тенденцията за преимущественото интегриране на ретротранспозоните в гени и области, богати на транспозонни последователности в пшеничния и ечемичния геноми (nested transposition) (Sabot et al 2005, Shirasu et al 2000). Други анализирани ДНК фрагменти представляваха част от различни неидентифицирани кодиращи ДНК области или показваха ниска степен на хомология с налични ДНК последователности в базата данни на житните. Вероятно това се дължи на факта, че голяма част от ДНК повторената фракция (включително транспозоните) в генома на житните не е характеризирана напълно.

REMAP и IRAP при *Triticale*

Прилагането и на двата метода при *Triticale* показва ясен амплификационен профил в диапазона 350-2500 б.д. (Фиг. 10). Фрагментите с низък интензитет в областта под 300 б.д не бяха включени в анализа. Броят на намножените ДНК фрагменти и степента на полиморфизъм между контролната и мутантна форма *Triticale* при различни праймерни последователности са представени в Табл. 3.



Фиг. 10 ДНК профил на *Triticale* контрола (К) и нейната мутантна форма (S), генериран чрез REMAP и IRAP. При REMAP е използван LTR праймер за BARE-1 в комбинация с праймери за микросателитните локуси Xgwm 456 (456L, 456R), Xgwm 566L (566L, 566R), Xgwm 2 (2L, 2R). При IRAP е използван единичен BARE-1 LTR праймер. 100bp маркер (O'Gene Ruler, Fermentas) е показан от двете страни на гела. Част от полиморфните фрагменти са обозначени със стрелки заедно с молекулните им размери.

Табл. 3 Нива на полиморфизъм при IRAP и REMAP профилите на контролната и мутантна форма *Triticale* MT47, получени с различни праймерни комбинации и IRAP профила при мутантните форми на *T. aestivum*.

Праймерни комбинации	Брой фрагменти	Полиморфни фрагменти	% полиморфизъм
Triticale			
BARE-1/Xgwm 456L	22	7	31,8 %
BARE-1/Xgwm 456R	18	7	38,9%
BARE-1/Xgwm 566L	15	3	20%
BARE-1/Xgwm 566R	15	3	20%
BARE-1/Xgwm 2L	15	5	33,3 %
BARE-1/Xgwm 2R	15	4	26,7 %
BARE-1/BARE-1 (IRAP)	15	3	20%
Total REMAP	115	32	27,8%
T. aestivum			
BARE-1/BARE-1 (IRAP)	23	9	39,1 %

Полиморфни фрагменти бяха детектирани при всички праймерни комбинации. Не беше установен видим полиморфизъм при IRAP продуктите при контролната и мутантна форми, с изключение на полиморфен фрагмент от 550 б.д., присъстващ в контролата, но липсващ в мутантната форма.

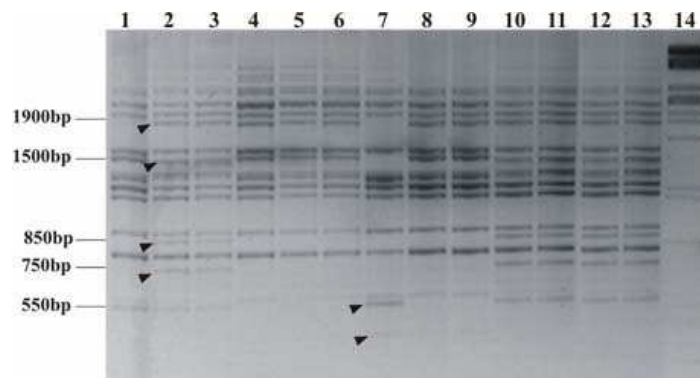
Както се очакваше IRAP профилът се наблюдаваше и при REMAP праймерните комбинации, въпреки че бяха наблюдавани и няколко вероятни ретротранспозон–микросателитни маркери, а именно фрагменти с дължина 1700 б.д., 342 б.д. и 433 б.д. (специфични за комбинация BARE-1/Xgwm 456R) и 711 б.д (специфичен за комбинация BARE-1/Xgwm 456L). REMAP фрагментите в диапазона 900-1100 бд при праймерна комбинация BARE-1/Xgwm 456L също така най-вероятно представляват SSR-BARE-1 продукти. Бяха секвенирани някои от фрагментите, специфични за REMAP профилите. Секвенционният анализ показва, че тези фрагменти са ограничени от BARE-1 и SSR праймерни последователности и действително представляват REMAP продукти. Като цяло най-висок процент на полиморфизъм при REMAP профилите с между контролната и мутантната форми *Triticale* бяха установени за праймерни комбинации BARE-1/Xgwm 456L и BARE-1/Xgwm 456R (съответно 31,8% и 39,1%) и BARE-1/Xgwm 2 L и BARE-1/Xgwm 2R (съответно 33,3 % и 26,7 %). От наличните в литературата данни тези микросателитни локуси кореспондират с гените S1 и S3, обуславящи сферококумния ефект в 3D и 3A хромозоми на хексаплоидната пшеница (*Salina et al, 2000; Roder et al, 1998*).

Присъствието на фрагменти, обхващащи SSR локуса Xgwm 456, разположен на 3D хромозома, беше неочаквано като се има предвид, че D геномът при *Triticale* MT 47 е заменен с ръжениия с изключение на 2D хромозома. Вероятно обяснение е присъствието на алелни последователности на 3D локуса в присъстващата 2D хромозома на MT47sph. Това би могло да стане при една реципрочна транслокация или дупликация на този локус между двете хромозоми – 2D и 3D. Това предположение е в съгласие с хипотезата, предложена от *Salina et al. 2000*, че сферококумната мутация може да се дължи на ДНК рекомбинации в центромерната област, водещи до генна дупликация. Съществуват данни, че EMC освен точкови мутации предизвиква и хромозомни преустройства от типа на транслокации (*Georgiev and Nikoloff, 1986*).

Получените данни предполагат наличието на геномни реорганизации, засягащи областта в близост до гените, обуславящи сферококумния фенотип на 3D хромозома, както и за наличието на по-голям брой BARE-1 елементи в близост до микросателитните локуси Xgwm456-3D и Xgwm2B-3A. Наличието на полиморфни IRAP и REMAP фрагменти показва, че са настъпили промени в организацията на BARE-1 елементите и /или/ съседни на тях участващи при мутантната форма в сравнение с контролната.

IRAP при мутантни форми пшеница

Резултатите, получени чрез IRAP метода, относно полиморфизма при сферококумните мутантни форми при *T. aestivum* са отразени на Фиг. 11.



Фиг. 11 IRAP профил при мутантни форми тип *sphaerococcum* при *T.aestivum*. Формите са представени както следва: контрола Садовска ранозрейка (1), 49Laest(2), 49 Lsph(3), 613sph(4), 613interm (5), 613aest(6), 6512aest(7), 6512sph(8), 6512homoz.(9), 49comp(10), 49L\13(11), 2Kx613spelta(12), 2Kx613 dense ear(13), λ Pst маркер (14).

Броят на получените фрагменти беше сходен с този, генериран с IRAP при *Triticale*. Нивото на полиморфизъм на отделните мутантни форми спрямо контролната форма Садовска ранозрейка-2 варираше от 9% до 26%, а общият полиморфизъм беше 39,1% (Табл. 3). Установено бе присъствието на ДНК фрагменти, сегрегирани с определени групи мутантни форми. ДНК фрагменти с дължина 1400 бд, 850 бд и 750 бд са специфични за мутантната група 49L (49Lsph, 49Laest, 49L/13, 49Lcomp) и 2Kx613. IRAP профилът се оказва неполиморфен в рамките на мутантната група 613sph, 613aest, 613 межд.клас (Фиг. 11, линии 4,5,6), но полиморфен спрямо контролната форма Садовска ранозрейка-2 (Фиг.11, линия 1) по маркер с дължина 1700 б.д. От друга страна се наблюдаваха разлики в IRAP профила, както в рамките на мутантната група 6512 sph, 6512aest, 6512 homoz. (Фиг. 11, линии 7,8,9), така и между тях и контролната форма по ДНК фрагменти с дължина 1800 б.д., 1500 б.д. и 550 б.д.

IRAP методът, независимо от това, че генерира по-малък брой маркери, показва по-висока степен на полиморфизъм в сравнение с SSAP при анализирани мутантни форми пшеница (Табл. 2 и 3).

Данните, получени от SSAP, IRAP и REMAP анализите, представляват интерес при тяхното сравнение с електрофоретичните профили на глутенините и глиадините, установени при мутантните форми тип *sphaerococcum* от предходни изследвания (Georgiev and Dekova 2005). Наблюдава се ясно изразено сходство по отношение на наблюдаваните полиморфни профили на ниво ДНК и белтъци. И в двата случая е налице съществен полиморфизъм, който позволява разграничаването на изходните мутантни форми 613 и 6512 от техните деривативи 2k x 613, 49Lsph/aest, 49comp, характеризирани се с различен фенотип – тип *aestivum*, *spelta*, *compactum*.

Твърде вероятно е наблюдаваната драстична промяна във фенотипа на тези мутантни форми да се дължи на присъствието и активността на генетични контролни елементи-транспозони. Макар, че на този етап липсват данни, за това, че транспозоните засягат пряко структурата и функцията на гените, обуславящи сферококумния фенотип, то идентифицирането от нас на транспозонов амплификационни продукти във или близост на съседните микросателитни локуси Xgwm 456 , Xgwm 2 в хромозоми 3D и 3A, както и данните от генетическия анализ за локализиране на тези гени са в полза на изказаната по-горе хипотеза.

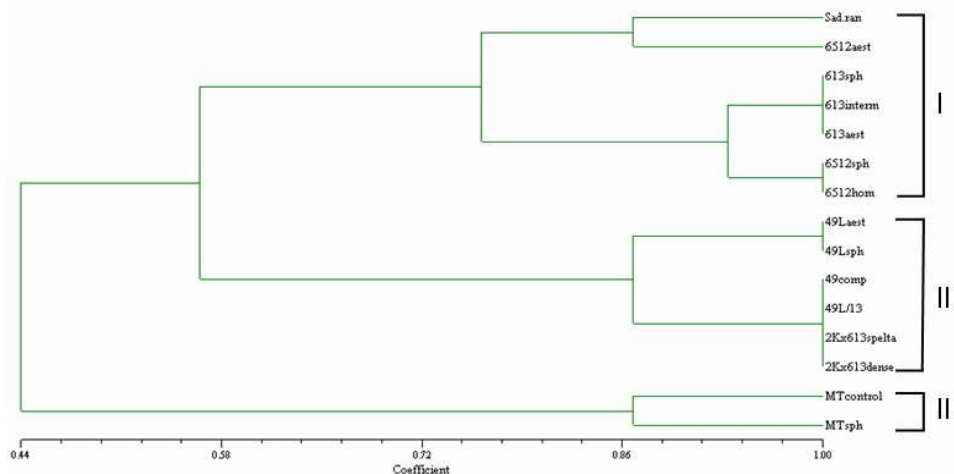
Бъдещо изолиране и по-детайлно проучване на полиморфни маркери, включващо секвениране и хромозомно картиране, ще бъде от съществено значение за характеризиране на гените, отговорни за *sphaerococcum* ефекта, както и за насищане на съществуващи генетични карти (Röder et al. 1998, Somers et al. 2004).

Генетично сходство на мутантните форми тип *sphaerococcum* при *T. aestivum* и *Triticale*

IRAP методът показва висок процент на полиморфизъм и генерира маркери, специфични за определени мутантни групи, които могат да бъдат използвани за ефикасно генотипиране на сферококумните мутанти. На базата на ДНК профила, генериран от IRAP, беше построена дендрограма, показваща степента на генетично сходство между сферококумните мутантни форми пшеница и *Triticale* (Фиг.12). Както се вижда от фигурата налице е ясна генетична дистанция между представителите на *T. aestivum* и *Triticale*, където се наблюдават три основни групи. Към първата група (I) се отнасят контролната форма Садовска ранозрейка-2, оригиналните мутантни форми 613sph, 6512 sph и техните сегреганти 613aest, 6512aest. Мутантната форма 6512 aest се оказва по-близка в генетично отношение до контролната форма Садовска ранозрейка-2 (0,867), отколкото до другите линии от група 6512. Втората основна група (II) включва мутантните форми, които представляват

деривати на оригиналните 613sph и 6512sph, получени след анализиращо кръстосване с контролната форма на *T.aestivum* : 49comp, 49L13, 2Kx613spelta, 2Kx613 комп и 49Lsph, 49Laest. Степента на генетично сходство между контролната форма и другите мутанти тип *sphaerococcum* намалява в реда 6512 (0.8000) → 613 (0.7333) → деривативна група (0.6000) → *Triticale* (0.4000) (Табл. 4). Според очакванията в отделна група (III) са представителите на *Triticale* MT47 (контролната и мутантната форма).

Генетичното сходство на анализираниите линии на базата на IRAP метода корелира с фенотипната характеристика на тези линии, както и резултатите, получени със SSR маркери от предишни изследвания (Georgiev et al. 2005).

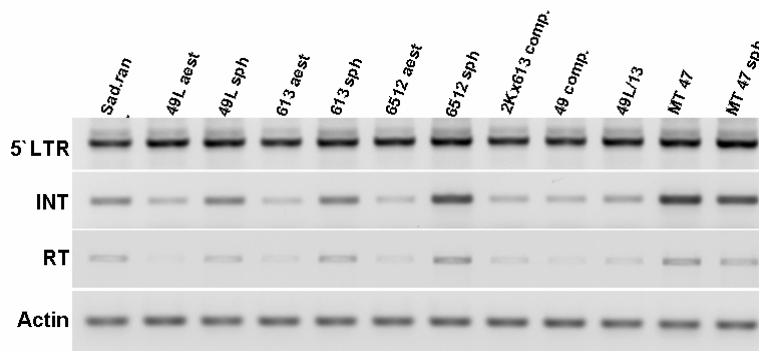


Фиг. 12 Дендрограма на мутантни форми тип *sphaerococcum*, получена въз основа на IRAP с единичен BARE-1 праймер.

Получените резултати показаха, че SSAP, IRAP и REMAP, основани на ретротранспозони, са ефективни и перспективни методи за генотипиране и оценка на вътревидовото мутантно разнообразие на форми с различен геномен състав, и могат успешно да се прилагат с други молекулни маркери. Установените геномни преустройства в мутантните форми тип *sphaerococcum*, засягащи BARE-1 или WIS-2-1A ретротранспозонните семейства, са следствие най-вероятно на тяхната динамика и активност. Фактът, че някои нови ДНК фрагменти се появяват в деривативните форми, но отсъстват в оригиналните (613 sph и 6512 sph), говори в полза на предположението, че активирането на ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A не е първично единично събитие след третиране с EMS. Твърде вероятно е анализиращите кръстоски на мутантните форми 613sph и 6512sph с контролната форма Садовска ранозрейка-2 да повлияват допълнително динамиката на BARE-1 и WIS 2-1A елементите в генома на получените деривативи, в резултат на което се наблюдава това голямо фенотипно разнообразие. Понастоящем не са известни молекулярните механизми, предизвикващи динамиката на транспозоните в анализираниите сферококумни мутантни форми. Твърде вероятно е EMS да действа индиректно чрез дестабилизиране на пшеничния геном, водещо до промени в организацията на хроматина и /или/ мутации в гени, участващи в регулацията на транспозонната активност.

Транскрипционен профил на ретротранспозона WIS 2-1A в мутантни форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* и 6X *Triticale*.

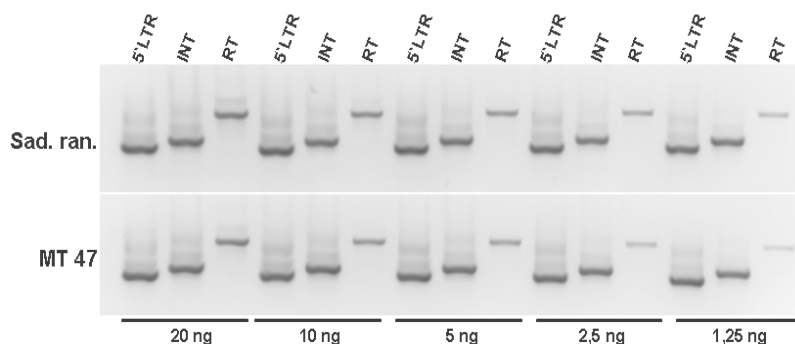
Характеризирането на експресията на подвижните генетични елементи е от съществено значение за изследванията относно механизма, индукцията и влиянието на транспозицията върху геномната структура, еволюция и биоразнообразието. Беше анализирана транскрипционната активност на ретротранспозона WIS 2-1A по отношение на три от кодираните от него области: 5`LTR, RT (обратна транскриптаза) и INT (интеграза).



Фиг. 13 Транскрипционен профил на WIS 2-1A ретротранспозонни последователности при мутантни форми пшеница и тритикале тип сферококум. Показано е нивото на транскрипция по отношение на три области от WIS 2-1A ретротранспозона- 5`LTR, INT и RT.

Както се вижда от Фиг. 13, РНК транскрипти и на трите области са детектирани във всички анализирани форми пшеница и *Triticale*, включително и контролните, което показва, че ретротранспозонът WIS 2-1A е транскрипционно активен в нормални условия. Сравнителният транскрипционен профил показва, че тези области са с различна степен на експресия, но съотношението между тях е сходно при различните анализирани линии. Най-висока експресия се наблюдава за 5`LTR областта, което е очаквано, като се има предвид преобладаването на solo LTR последователности над цели ретротранспозони, както и вероятността от наличието на транскрипти от съседни индуцирани гени. Интерес представлява разликата в количествата транскрипционни продукти между RT и INT. Сред анализираните линии количеството транскрипционен продукт, специфичен за INT областта е приблизително от 2 до 4 пъти повече, отколкото за RT област, въпреки че те представляват съседни компоненти в структурата на ретротранспозона. Разликите в нивото на намножаване на тези ампликони би могло да се дължи на различната им копийност в генома или на ефикасността на амплификацията.

За да се определи прецизно ролята на тези два фактора – копийност на WIS 2-1A и ефикасност на амплифицирането – за наблюдаваните профили на експресия, беше проведено PCR намножаване на геномни ДНК (5 разредки) на контролните форми Садовска ранозрейка-2 и *Triticale* MT47 (Фиг. 14).



Фиг. 14 Геномен ДНК амплификационен профил на областите 5`LTR, INT и RT при контролните форми Садовска ранозрейка-2 и *Triticale* MT47.

Както се вижда от Фиг.14 и двете форми на ниво геномна ДНК показват сходен транскрипционен профил на анализирани домени, а именно понижаване на количеството транскрипти в реда 5`LTR> INT> RT, като разреdkите не повлияват съществено на тяхната амплификационна ефективност. На ниво копи ДНК амплификационния профил се запазва при *Triticale*, докато при пшеничните форми се наблюдава отклонение, изразено в повишеното 5`LTR/ INT съотношение на транскриптите. Въз основа на получените резултати от сравнителния PCR анализ на геномна и копи ДНК се установи, че транскрипционните нива на 5`LTR, INT и RT областите се дължат на различия в тяхната копийност в съответните геноми и /или/ на областно-специфични характеристики, отколкото на условията на PCR реакциите. Преобладаването на INT спрямо RT домени, детектирано на ниво геномна и копи ДНК, може да е резултат от наличието на дефектни RT копия съдържащи делеции и/ или точкови мутации, непозволяващи ефективно PCR амплифициране. Тези резултати са в подкрепа на предишни изследвания, показващи, че структурно сходни ретротранспозони като WIS 2-1A и BARE-2 елементите, са представени от копия с дефектни вътрешни кодиращи области, генерирани в процеса на транспозицията (Muniz et al 2001, Tanskanen et al 2007).

Като цяло беше установен по-интензивен транскрипционен профил на WIS 2-1A елемента при *Triticale*, отколкото при пшеничните мутантни форми и тяхната контрола, независимо, че на ниво геномна ДНК копийността на този ретротранспозон е по-висока при пшеницата *T. aestivum* (Фиг. 13 и 14). От предходни изследвания е установено редуциране на ретротранспозонов последователности, включително и на WIS 2-1A, при формирането на алохексаплоидното *Triticale* (Muniz et al 2001, Pagnotta et al 2009, MA and Gustafson, 2008). Твърде вероятно наблюдаваните различия в степента на транскрипция при *T.aestivum* и *Triticale* да е резултат от активирането на неактивни копия при *Triticale*, като дозово кампенсационно събитие в отговор на ретротранспозонова редукция. Становището за транскрипционно активиране е в съгласие с постулата за "геномен шок", водещ до активирането на растителни транспозони в резултат на комбинирането на еволюционно разнородни геноми. Установено е активирането на WIS 2-1A транскрипти в новосинтезирани пшенични амфидиплоиди, получени в резултат на междувидова хибридизация и последващо хромозомно удвояване (Kashkush et al 2002).

Получените резултати показват също така, че третирането с EMC повлиява профила на транскрипция на ретротранспозона WIS 2-1A в анализирани мутантни форми. Както е видно от Фиг. 13, промените в транскрипционния профил са по-ясно изразени при INT и RT областите. Интензивността на PCR транскриптите на 5`LTR ампликона е твърде висок, което не позволява тяхното ефикасно количествено определяне и

разграничаване на мутантните форми. Това определя INT и RT областите като най-подходящи за детектиране на различия в транскрипционния профил на WIS 2-1A между анализирани форми. Друга причина за по-удачното използване на INT и RT областите за анализ на активността на ретротранспозона WIS 2-1A е че се детектират основно цели ретротранспозонови копия, способни към транспозиция и същевременно се пренебрегват дефектните LTR последователности. Предишни изследвания също подкрепят надеждността на INT и RT ампликоните за установяване на количеството и геномната организация на ретротранспозоните WIS2-1A и BARE-1 при различни житни геноми (Pagnotta et al 2009).

При сравнение на мутантни форми пшеница се наблюдава очевидно повишение на транскрипционното ниво при оригиналните мутантни форми 613 sph и 6512sph в сравнение с контролната форма Садовска ранозрейка-2. Въпреки че оригиналните мутантни форми не могат да бъдат разграничени фенотипно, резултатите от молекулярните методи и транскрипционния анализ, базирани на BARE-1/WIS 2-1A ретротранспозони, показваха наличието на структурно и функционално генетично вариетегране.

Интересно наблюдение представлява факта, че нивото на транскрипция намалява в ревертантните форми тип *aestivum* (613 aest и 6512 aest) и деривативните форми (49L/13, 2Kx613 compactoid и 49 comp.) до нива, равни или по-ниски от това на контролната линия (Фиг. 13). Очевидно е, че при кръстосването на мутантните форми с контролната форма и реверсията към дивия *aestivum* фенотип се индуцират събития, водещи до последващо понижаване на експресията на ретротранспозона WIS 2-1A, като причината за този феномен не е известна на този етап.

Трябва да се отбележи, че установяване на транскрипционна активност не означава задължително транспозиционна активност. Обратната транскрипция като процес е предразположена към грешки и често води до генерирането на популация от транскрипционно неактивни дъщерни копия. Независимо от това транскрипцията е основен критерий за активността на даден ретротранспозон. Способността да генерира транскрипти, както и модулирането на транскрипционната активност в мутантните форми тип сферококум, свидетелства за участието на BARE-1/WIS 2-1A елементите в наблюдаваното фенотипно разнообразие при анализирани мутантни линии. Понастоящем не са известни генетичните механизми, обуславящи ретротранспозонната динамика при мутантните линии тип *sphaerococcum*, но твърде вероятно EMC като стресов фактор играе роля за активирането на ретротранспозоните чрез дестабилизиране на генома, включващо промени в хроматиновата структура и /или/ мутации в гени, свързани с регулацията на транспозонната активност.

V. ИЗВОДИ

Резултатите от експерименталната работа, проведена в рамките на дисертационния труд, дават основание да се формулират следните основни изводи:

- 1) С помощта на монозомната серия на Chinese spring е установена локализацията на гените Sp2 и Sp3 в 3A и 3B хромозоми, свързани с проявата на *sphaerococcum* ефекта.
- 2) Проучваните мутантни форми тип *sphaerococcum*, получени след въздействие с EMC, се характеризират с геномна нестабилност, изразяващата се в структурната и функционална динамика на Ac-хомоложните транспозонни последователности и ретротранспозоните от семействата BARE-1 и WIS 2-1A
- 3) Ac-подобните последователности се характеризират с различна степен на хомоложност с царевичния Ac9 елемент, която е областно специфична и се дължи на структурна дивергенция на тези елементи. ДНК последователностите, хомоложни на централната (екзонна) част на царевичната Ac транспозаза, показват ниска степен на хомология и структурно разнообразие за разлика от Ac хомоложните последователности, съответстващи на екзон-интрон граничните участъци.
- 4) Копийността на Ac хомоложните последователности корелира с нивото на плоидност на растителните геноми.
- 5) Установено е модулиране на статуса на метилиране на Ac хомоложните последователности при MT47 *Triticale*.
- 6) Установено е, че флуоресцентната in situ хибридизация позволява ефикасното разграничаване на геномно ниво на оригиналните мутантни форми 613 и 6512.
- 7) Ретротранспозоните от семейството WIS 2-1A са транскрипционно активни в геномите на контролните и мутантни форми пшеница и *Triticale*. Установено е, че профилът на транскрипционната активност на WIS 2-1A при различните мутантни форми корелира с проявата на сферококумния фенотип.
- 8) Нивото на транскрипция на ретротранспозона WIS 2-1A е по-високо при *Triticale* в сравнение с *T. aestivum*, което свидетелства за наличието на дозово компенсаторен механизъм вследствие на редуцирането на WIS 2-1A копията при формирането на алохексаплоидното *Triticale*.
- 9) Подвижните генетични елементи, хомоложни на царевичния Ac9 елемент и ретротранспозоните BARE-1 и WIS 2-1A, са подходящи молекулярни маркери за анализ на вътревидовото мутантно разнообразие в генома на житните и влиянието на различни стресови фактори върху геномната стабилност.

VI. ПРИНОСИ

1. Изолирани и секвенирани са пшенични транспозонни последователности, за които е установено наличието на полиморфизъм и различна степен на хомология с царевичния Ac елемент в геномите на мутантните форми тип *sphaerococcum* при 6х пшеница и *Triticale*.
2. За първи път бяха приложени молекулярни маркерни системи, основани на ретротранспозоните, за анализ на мутантното разнообразие и генотипиране на сферококумни форми пшеница и *Triticale*.
3. С помощта на REMAP е установен полиморфизъм в областта на гените Sp1 и Sp3, локализирани в 3D и 3A хромозоми, и обуславящи проявата на сферококумния фенотип.
4. Установена е диференциална степен на експресия на ретротранспозона WIS 2-1A в отделните мутантни форми, корелираща с проявата на *sphaerococcum* ефекта.

СПИСЪК НА ЛИТЕРАТУРАТА

- Altinkut A.**, Raskina O., Nevo V.M., Belyaev A. (2006 b) En/Spm- like transposons in poacea species: Transposase sequence variability and chromosomal distribution, Cellular & Molecular Bioilogy Letters, 1, 214-219.
- Dvorak J.**, Akhunov E.D., Akhunov A.R., Deal K.R. и Luo M.C. (2006) Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. Mol. Biol. Evol., 23, 1386-1396.
- Georgiev S.** (1979) EMS - induced sphaerococcum mutation in *T. monococcum* L. Cereal Research Communications, 7 (3), 183-189.
- Georgiev S.** (1980) Cytology of structural sphaerococcoid mutants produced in *T. durum* by EMS treatment. Genetics and Plant Breeding, 4, 280-286.
- Georgiev S.** (1982) EMS-induced sphaerococcum mutation in MT-Triticale, Weat Inf. Serv., Japan, 55, 32-35.
- Georgiev S.** (2004) Doctoral thesis "Molecular genetics and cytogenetics investigations of genome functional activity in *Triticum*, *Hordeum* and *Silene* L.", Sofia.
- Georgiev S.**, Nikoloff H. (1986) A cytogenetic study of speltoid mutants induced by ethyle methanesulphonate treatment of *Triticum aestivum*. Genetika i Seleksiya, 19, 1-9.
- Georgiev S.**, Yordanov Y., Todorovska E. (2005) Microsatellite studies of the sphaerococcum mutant forms, Biotechnol. & Bitechnol. Eq., 3/19, 47-51
- Harbert N.P.**, Flavell R.B., Thompson R.D. (1987) Identification of a transposon-like insertion in a *Glu-1* allele of wheat, Mol. Gen. Genet., 209, 326–332
- Josifovska S.**, Yordanov Y., Dekova T., Vassilev D., Georgiev S. (2010) AFLP analysis of the genetic variability of the sphaerococcum mutant forms of wheat and Triticale. Genetics and Breeding (in press)
- Kashkush K.**, Feldman M. и Levy A.A. (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. Genetics, 160, 1651-1659.
- Ma X-F.**, Gustafson J.P. (2008) Allopolyploidization-Accommodated Genomic Sequence Changes in Triticale. Annals of Botany, 101, 825-832.
- Muniz L.M.**, Cuadrado A., Jouve N., Gonzalez J.M. (2001) The detection, cloning, and characterisation of WIS 2-1A retrotransposon-like sequences in *Triticum aestivum* L. and *xTriticosecale Wittmack* and an examination of their evolution in related *Triticeae*. Genome, 44, 979–989.
- Pagnotta M.A.**, Mondini L., Porceddu E. (2009) Quantification and organization of WIS2-1A and BARE-1 retrotransposons in different genomes of *Triticum* and *Aegilops* species. Mol. Genet. Genomics, 282, 245-255.
- Queen R.A.**, Gribbon B.M., James C., Jack P., Flavell A.J. (2004) Retrotransposonbased molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. Mol. Genet. Genomics, 271, 91–97.
- Rao, M.V.** (1977) Mapping of the sphaerococcum gene "S" on chromosome 3D of wheat. Cereal Res. Comm., 5, 15–17.
- Roder M.S.**, Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics, 149, 2007-2023.
- Sabot F.**, Guyot R., Wicker T., Chantret N., Laubin B.et al. (2005) Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations. Mol. Genet. Genomics, 274, 119–130.
- Salina E.**, Börner A., Leonova I., Korzun V., Laikova L. , Maystrenko O., Röder M.S. (2000) Microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum*. Theor. Appl. Genet., 100(5), 686-689.
- Sears E.R.** (1947) The sphaerococcum gene in wheat. Genetics, 32, 102-103.
- Shirasu K.**, Schulman A.H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000) A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. Genome Res., 10, 908–915.
- Somers D.J.**, Isaac P., Edwards K. (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 109, 1105–1114.
- Tam S.M.**, Mhiri C., Vogelaar A., Kerkveld M., Pearce S.R., Grandbastien M.A. (2005) Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theoretical and Applied Genetics, 110, 819-31.
- Tanskanen J.A.**, Sabot F., Vicient C., Schulman A.H. (2007) Life without GAG: The *BARE-2* retrotransposon as a parasite's parasite. Gene, 390,166–174

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Bonchev, G., Pearce, S., Georgiev, S. (2010) Retrotransposons and ethyle methanesulphonate induced genetic diversity in sphaerococcum mutant forms of hexaploid wheat and Triticale. Cent. Eur. J. Biol. (Springer), vol. 5(6), 765-776

S. Georgiev, **G. Bonchev**, Z. Angelova, M. Kitanova (2008) Genetic analysis of sphaerococcum mutant forms of hexaploid wheats and triticale MT47, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 22/4, 957-958.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Специализация по програма „Marie Curie” “Molecular biomarkers as indicators of environmental stress”, 5 месеца, 2005-2006 год., Университет Съсекс, Брайтън, Великобритания.

Десета юбилейна научна сесия „40 години Биологически факултет” 2003, Georgiev S., Iordanov I., **Bonchev G.** “Molecular genetic and cytogenetic studies of Ac-like transposable elements in sphaerococcum mutant forms”

Десета юбилейна научна сесия „40 години Биологически факултет” 2003, Georgiev S., **Bonchev G.** Iordanov I., “The chromosomal location of the sphaerococcum genes in sphaerococcum mutant forms of T. aestivum L.”

Доклад на EMBO workshop “Molecular mechanisms of transposition. Its regulation and evolution” 26-30 юни 2004, Роскоф, Франция.

Plant GEM 2008, Албена, България; доклад, S06.1. **Bonchev G.**, Stoilov L., Todorovska E, Angelova Z., Kitanova M and Georgiev S. (2008). Characterization of AC-transposon-homologous sequences in wheat genome.

Regional Training Course „PCR Based Molecular Marker Systems”, Катовице, Полша, 30 юни- 11 юли 2008.

Постерна сесия на FAO/IAEA International Symposium on Induced Mutations in Plants, Виена, Австрия. 12-15 август, 2008, **Bonchev G.**, S. Pearce, S. Georgiev. „Development of retrotransposon-based molecular markers for fingerprinting analyses of hexaploid wheat and triticale sphaerococcum mutant forms”.

Постерна сесия на FEBS Workshop “Adaptation potential in plants”, 19-21 март 2009 **Georgi Bonchev**, Sevdalin Georgiev. „BARE-1/Wis 2-1A retrotransposon activation: a plant adaptation response to cold and heat stress in cereals”

Изразявам искрената си признателност към научните ми ръководители проф. д-р Севдалин Георгиев и доцент д-р Любомир Стоилов.

Благодаря на колегите си от секция „Молекулярна генетика“ на Института по физиология на растенията и генетика, катедра „Генетика“ на Биологическия факултет и АгробιοИнститута за полезните съвети и техническа помощ за изработването на настоящата дисертация.

Благодаря на родителите ми, съпругата ми и близките ми за неоценимата подкрепа и вяра в мен във всички трудни моменти.