

Таня Васкова Кърцева

**ПРОУЧВАНЕ ЕФЕКТА НА МУТАНТНИ ГЕНИ
ВЪРХУ ВАЖНИ БИОЛОГИЧНИ КАЧЕСТВА
ПРИ ДОМАТИ (*Solanum lycopersicum* L.)
И ПШЕНИЦА (*Triticum aestivum* L.)**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Професионално направление: **4.3.** „Биологически науки“
По научна специалност: **шифър 01.06.06** „Генетика“

Научни консултанти:

проф. дбн Бистра Атанасова

доц. г-р Светлана Ланджева

Рецензенти:

проф. г-р Николай Ценов

доц. г-р Анелия Янчева

София

2014 г.



Дисертацията и авторефератът са отпечатани с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0025, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007—2013) и съфинансиран от Министерството на образованието и науката в Република България.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

GA – GA₃, гибберелинова киселина

PEG – polyethylene glycol, полиетилен гликол

QTL – Quantitative Trait Locus/loci, локуси за количествени признаци

ROS – Reactive Oxygen Species, реактивни кислородни форми

Използвани сортове обикновена пшеница:

AB – April Bearded

B – Bersée

MH – Maris Huntsman

MW – Maris Widgeon

Съединения

МДА – Малонилдиалдеhid

H₂O₂ – Водороден пероксид

УВОД

Генните мутации са унаследяеми изменения в последователността на нуклеотидните бази в ДНК в рамките на един ген. Могат да бъдат точкови или инсерции и делеции (indels). Точковите мутации засягат единични нуклеотиди и обикновено представляват субституции, докато инсерциите и делециите се отнасят до вмъкване/отпадане на ДНК участъци с различна дължина. Голяма част от тях са спонтанни и стоят в основата на генетичното разнообразие и еволюцията. Други са индуцирани от фактори на средата като различни лъчения, химични реагенти и други. Физичният и химичният мутагенез се използват широко за създаване на нови мутации и разширяване на мутантните генетични ресурси като основа за изучаване функцията на гените. Индуцирани мутации в моделни видове като *Arabidopsis*, както и в домати, ориз, ечемик, царевица, тютюн и грах направиха възможно идентифицирането на редица гени, участващи в метаболитни и сигнални пътища, отговорни за развитието и растежа, както и на гени, контролиращи устойчивостта към редица видове биотичен и абиотичен стрес.

Доматите (*Solanum lycopersicum* L.) и обикновената пшеница (*Triticum aestivum* L.) са едни от основните култури в Европа, включително България. И при двата вида са известни голям брой спонтанни и индуцирани мутации, засягащи индивидуални гени с определена функция, като при някои от тях е установен и плейотропен ефект върху важни стопански, физиологични, морфологични и други признаци.

Известно е, че едни от най-важните качества на културните растения като продуктивност, продължителност на вегетационния период, хранителни и пазарни качества, толерантност към неблагоприятни фактори на околната среда (засушаване, засоляване, ниски или високи температури през различните етапи от развитието на растенията) са комплексни и в повечето случаи полигенно обусловени признаци. Това значително затруднява както проучването на генетичния контрол на тези признаци, така и създаването на генотипове, притежаващи ценни стопански качества. Установяването на плейотропен ефект на мутантен ген с ясно фенотипно изражение върху някои от горепосочените признаци допринася значително за ускоряване и улесняване на процеса по генетичното подобряване по отношение на този признак. За установяване и изследване на плейотропен ефект на даден ген са необходими серии от изогенни/почти изогенни линии, т.е. серии от линии, създадени на основата на един генотип и различаващи се единствено по отношение на локуса, носещ мутантния ген.

В настоящата работа са изследвани плейотропните ефекти на мутантни гени при домати и обикновена пшеница върху важни биологични качества и стопански признаци. За целта при доматите са използвани серии почти-изогенни линии, носещи: три мутантни гена, контролиращи отсъствие на антоциани; два мутантни гена, водещи до повишено количество ликопен в плодовете и мутанта *bs*, обуславящ тъмния цвят на обвивката на семето. Проучено е тяхното влияние върху важни характеристики на семенната обвивка, покълването при два вида стрес (засоляване и ниски температури) и качеството на плода (съдържание на редуциращи захари и киселини, витамин С и каротеноидите β -каротин и ликопен). При пшеницата са използвани четири серии от почти-изогенни линии, носещи *Rht* (**Reduced height**) мутантни гени за ниско стъбло. Проучен е техният ефект върху растежа и някои физиологични реакции на млади растения в отговор към засушаване, както и влиянието им върху височината и продуктивността при възрастни растения.

АРГУМЕНТАЦИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Изследвания на плейотропни ефекти на мутантни гени при *S. lycopersicum*

Доматите са една от най-широко отглежданите и консумирани зеленчукови култури. Голяма част от жизненоважните за човека витамини (А, В и С), минерали (К), флавоноиди и фитостероли се набавят именно чрез тяхната консумация. Те са и основен източник на каротеноидите ликопен, на който се дължи червения цвят на плодовете, и β -каротин.

От съвременните сортове домати се изисква да притежават комплекс от признаци, свързани с продължително съхранение, повишена продуктивност, подобрена хранителна стойност, устойчивост към биотичен и абиотичен стрес. Днес, с големия интерес към био продукцията и прием на полезни за нас вещества, свързани с доброто ни здраве и превенция към различни заболявания, от естествени и натурални продукти, особено актуална тема е намиране на генетичен ресурс за създаване на сортове домати, съдържащи голямо количество витамин С, ликопен, β -каротин и антоциани в плодовете.

При доматите са познати над 600 индуцирани и спонтанни мутации (Chetelat, 2005), някои от които контролират ценни стопански качества. Обект на нашите проучвания са мутации, засягащи: синтеза на антоциани, кафявия цвят на семената и повишеното съдържание на ликопен и витамин С.

Изследвания на плейотропни ефекти на мутантни *Rht* гени при *T. aestivum*

Климатът в Юго-Източна Европа, включително България, се характеризира с чести периоди на засушаване в различни етапи от вегетацията, основно през есента по време на покълване, поникване и гарниране на есенните посеви и през пролетта по време на цъфтеж (Alexandrov et al. 2004, Казанджиев и кол. 2011). Когато развитието на растението в определени периоди протича при воден дефицит, получаването на стабилни добиви от зърно зависи до голяма степен от неговата толерантност към стрес, т.е. от неговите възможности да поддържа своята жизненост, растеж и репродуктивност в условия на стрес (Turner, 1979). Толерантността на пшеницата към засушаване е комплексен признак, включващ добро покълване и поникване, оптимална осморегулация, мобилизиране на защитните системи в растението за намаляване на тъканните увреждания предизвикани от стреса.

Гените *Rht* за ниско стъбло при пшеницата представляват мутации в гените, кодиращи т. нар. DELLA протеини. Това са ядрени белтъци, които функционират като транскрипционни репресори в гиберелиновия сигнален път и потискат растежа на растението. Мутациите водят до редуциране размера на растителните органи, включително скъсяване на колеоптила и стъблото, а чрез плейотропни ефекти върху фотосинтетичната активност (Morgan et al. 1990) и усвояването на хранителни вещества (Gooding et al., 2012; Loddo and Gooding, 2012) - и до повишена продуктивност (Flintham et al., 1997).

Засилената интродукция на гиберелин-нечувствителни *Rht* гени в българските сортове пшеница през последните десетилетия (Ganeva et al. 2005) и тенденциите към ранно есенно засушаване поставят въпрос за ефекта на тези гени върху растежа на млади растения в условия на воден дефицит. От значение е да се изясни и тяхната роля за формиране защитните реакции на растението при стрес. На базата на изследване на основни маркери на стрес може да се определи степента на възникналия при засушаване оксидативен стрес и да се сравни нивото на толерантност на генотипите, носещи различни мутантни *Rht* гени. Получаването на оптимални добиви зависи както от еко-климатичните условия, така и от генетични фактори (Flintham et al. 1997). Ето защо, интерес представлява сравнително изследване на ефекта на гиберелин-нечувствителни мутантни *Rht* гени върху продуктивния потенциал на растенията при специфичните за нашата страна климатични условия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на изследванията в дисертационния труд е проучване плейотропните ефекти на мутантни гени при *S. lycopersicum* и *T. aestivum* върху важни биологични и стопански признаци, свързани с толерантността към абиотичен стрес, качеството и продуктивността.

Задачите за постигане на тази цел включват:

1. Установяване на ефектите на мутантни гени върху покълване, растеж и нивото на оксидативен стрес в ранни онтогенетични фази:

1.1. Проучване на скоростта на покълване на мутант *brown seed* при *S. lycopersicum* в присъствие на три безантоцианови гена при оптимални и стресови условия (засоляване и ниски температури)

1.2. Проучване на промени в растежа на растенията и съдържанието на стресови маркери в линии *T. aestivum*, изогенни по *Rht* гени, в отговор на индуциран воден дефицит.

2. Установяване на ефектите на мутантни гени върху важни биологични и стопански качества във фаза зрялост:

2.1. Проучване на ефекта на гени при *S. lycopersicum* върху съдържанието на редуциращи захари и киселини, витамин С и каротеноидите ликопен и β -каротин, свързани с хранителните и вкусови качества на плодовете.

2.2. Проучване влиянието на *Rht* гени при *T. aestivum* върху височината на растенията и компонентите на добива.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията са извършени върху изогенни линии домати и пшеница.

1. Експериментален материал при *Solanum lycopersicum*

В изследванията са включени линията Ailsa Craig (AC) и нейните изогенни линии по мутантните гени **ah** (*Hoffmann's anthocyaninless*), **aw** (*anthocyanin without*), **bls** (*baby lea syndrome*), **bs** (*brown seed*), **hp** (*high pigment*), **og^c** (*old gold – crimson*), както и изогенни линии, носещи различни комбинации от мутантните гени **AC og^c ah**, **AC og^c hp**, **AC og^c bls**, **AC ah bs**, **AC aw bs** и **AC bls bs**. Линиите AC, AC *ah*, AC *bls*, AC *bs*, AC *hp*, AC *og^c* са създадени и описани от Maxon-Smith and Ritchie (1982), а AC *aw*, както и всички двойни мутантни линии са създадени от проф. Б. Атанасова, бивш Институт по Генетика, БАН, понастоящем Институт по Физиология на Растенията и Генетика, БАН.

2. Експериментален материал при *Triticum aestivum*

Изследванията са извършени при четири серии от почти-изогенни линии, създадени на основата на сортовете April Bearded, Bersée, Maris Huntsman и Maris Widgeon. Всяка серия включва шест линии, носещи алелите ***Rht-B1a+D1a*** (*rht*, дива алел, високи контроли), ***Rht-B1b***, ***Rht-B1c*** и ***Rht-D1b***, и комбинациите ***Rht-B1b+D1b*** и ***Rht-B1c+D1b***, общо 24 линии. Растителният материал е любезно предоставен от доц. д-р Андреас Бюрнер, Институт по Растителна Генетика и Изследване на Културните Растения (IPK), Гатерслебен, Германия.

3. Методи

3.1. Покълване на семената при оптимални и стресови условия– изследванията се провеждаха на семена от линията AC и нейните изогенни линии по мутантните гени *ah*, *aw*, *bls*, *bs*, *ah bs*, *aw bs* и *bls bs*.

3.1.1. Условия на провеждане на опита

Сравнителните експерименти във фаза „покълване” се провеждаха в камера без осветление. Семената предварително се обеззаразяваха с 0.1% разтвор на калиев перманганат за пет минути и след това се изплакваха многократно с дестилирана вода, след което се подсушаваха с филтърна хартия. Семената се покълваха при оптимални условия, засоляване и ниски температури. По петдесет семена от всеки генотип се покълваха на тъмно в петриеве блюда с диаметър 14 см, съдържащи синтетична гъба (дунапрен) с дебелина 0.5 см и слой филтърна хартия. Покълването се визуализираше с появата на зародиша, като критерий за оценка на кълнителната енергия бе използвано времето, необходимо за покълване на 50% от семената. Опитът беше проведен в три повторения.

А) Оптимални условия - след поставянето на дунапрена и филтърната хартия в петриевите блюда, се добавяха по 25 мл дестилирана вода. Петриевите блюда се поставяха в растежна камера без светлина, при температура $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Покълването се отчиташе два пъти на ден (в 9.00 и 14.00 часа всеки ден).

Б) Ниска температура - опитната постановка е както при оптимални условия, но семената покълваха в камера, поддържаща температура $13^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

В) Солев стрес – опитната постановка е както при оптимални условия, но вместо дестилирана вода в петриевите блюда се добавяше по 25 мл воден разтвор на 120 mM NaCl.

3.1.2. Водно поемане

По 100 семена от всеки генотип с предварително определено водно съдържание се претегляха и потапяха в 50 мл дестилирана вода. Водопоемането се определяше тегловно през определени интервали от време (след 1-ви, 5-ти и 24-ти час) и е представено като процент от началното тегло на семената.

3.2. Морфологични и хистохимични изследвания на семенната обвивка- изследванията се провеждаха на семена от линията АС и нейните изогенни линии по мутантните гени *bs*, *ah bs*, *aw bs* и *bls bs*. Семената предварително се поставяха в дестилирана вода за около 3 часа. За включването им в ледено блокче, те се нареждаха концентрично върху масичката на микротомата и се накапваха няколко пъти през определен интервал от време с леденостудена вода. С помощта на микротом се получаваха серия от срези с дебелина 50µm. Всички срези се събираха върху предметно стъкло, разстилаха се внимателно с помощта на капка вода и се изсушаваха или се използваха директно за оцветяване.

Установяване съдържанието на компонентите на семенната обвивка с помощта на цветни реакции - наличието или отсъствието на различни компоненти на семенната обвивка се установиха със следните реакции:

Periodic acid-Schiff (PAS) – тази реакция се използва за установяване наличието на полизахариди; Alkali blue – установява се съдържанието на калоза; Sudan black - реакцията е предназначена за локализиране на липиди; Nitroso reaction - установява се наличието на полифеноли; Vanillin-HCl тест за локализация на кондензирани танини; Phloroglucinol-HCl тест. - за установяване наличието на лигнини.

3.3. Лабораторни експерименти за определяне нивото на оксидативен стрес при засушаване и толерантността на растенията

Изследванията се провеждаха с изогенните линии по *Rht* гените при четири сорта пшеница.

3.3.1. Условия на отглеждане на растенията и индуциране на засушаване

Семената се накисваха за половин час във вода и се нареждаха в петриев бляда върху навлажнена филтърна хартия. Покълването се осъществяваше в термостат при $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ на тъмно. След три дни растенията се прехвърляха в пластмасови кутии на хранителен разтвор $\frac{1}{2}$ Hoagland и се отглеждаха във фитостатно помещение при температури $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ / $16\pm 1^{\circ}\text{C}$ (дневни/нощни) и режим 16 часа ден и 8 часа нощ. След три дена растенията се разделяха на две групи: първата група (20-25 растения от всяка изогенна линия) се поставяха на пълен разтвор на Hoagland (**контролни растения**); при втората група (20-30 растения от всяка изогенна линия) към пълния разтвор на

Noagland се добавяше 15 % разтвор на полиетилен гликол (polyethylene glycol, PEG 6000, Merck) (**стресирани растения**). Във всяка кутия бяха отглеждани по два генотипа както в контролата, така и при стрес. Третирането на растенията продължаваше 8 дни. За всеки сорт серията от шест изогенни линии се залагаше в отделен експеримент.

3.3.2. Определяне на растежни параметри, съдържание на пролин, водороден пероксид и малонилдиалдехид в листа

След 8-дневно третиране с 15% PEG в хранителен разтвор се измерваха дължина на надземна част и корени, ширина на листа (първи напълно развит лист), съдържание на пролин, H_2O_2 и МДА в листа. Стадият на развитие на растенията беше трети същински лист, добре развит при контролните растения и не напълно развит при стресираните. Растежните показатели се измерваха върху най-малко 15 добре развити растения от всяка линия и вариант. Корените се промиваха с дестилирана вода, подсушаваха се върху филтърна хартия и се измерваше най-дългия корен. Дължината на надземната част се определяше от семето до края на най-дългия лист. Ширината на листа се измерваше върху първи лист в най-широката му част.

След снемане на биометричните данни от всяка линия и вариант се взимаха по две средни проби от листата (всяка 0.7г) за определяне на биохимичните показатели. Съдържанието на H_2O_2 се определяше в двете проби непосредствено след взимане на материала, а съдържанието на МДА и пролин се определяше в едната проба веднага, а втората се замразяваше и анализираше след няколко дни. Анализът на всяка проба се правеше в две технически повторения.

Съдържанието на пролин в листа беше определяно по метода на Bates et al. (1973). Определяне на съдържанието на водороден пероксид се извършваше по метода на Sergiev et al. (1997). Съдържанието на липидни прекиси беше определяно по метода на Cakmak and Horst (1991).

3.4. Биохимични анализи за определяне качеството на плодове домати

На една и съща дата се вземаха по 10 плода от всяка изогенна линия (AC, *ah*, *aw*, *bls*, *hp*, *og^c*, *og^c ah*, *og^c hp*, *og^c bls*) в еднаква зрялост, със сходен цвят и големина. От тези плодове се правеше средна проба по следния начин: всеки плод се разрязваше на 4 и се вземаха две срещуположни четвъртини. След това се смляха до пълното хомогенизиране и получаването на фина каша. От нея се вземаше необходимото количество за всеки един от изследваните показатели. Експериментите бяха проведени в три повторения през три години (2004 г., 2005 г. и 2007 г.), като растенията са

отглеждани на опитното поле на Институт по Физиология на растенията и Генетика – 13ти км.

Съдържанието на ликопен и β -каротин беше определено по хроматографски метод (Manuelyan and Yordanov, 1967). Количеството на витамин С беше определено по метода на Pongraz (1971). Процентното съдържание на редуциращите захари беше определено по титриметричен метода на Шоорл (Click, 1971). Количеството на киселините, отново представено в проценти, беше определено чрез титруване с 0.01 N NaOH, като за индикатор се използва фенол-фталеин и се титрува до розово оцветяване.

3.5. Агрономическа оценка на изогенните пшенични линии при полски експерименти

Агрономическата оценка на 24 изогенни пшенични линии беше направена в четиригодишен полски експеримент, изведен на опитното поле на Институт по Физиология на растенията и Генетика, БАН (София, 42°41'N, 23°19' E) през 2007, 2008, 2010 и 2011 г. За целта, в средата на месец февруари от всяка линия се залагаха по 300 семена върху навлажнена филтърна хартия в петриevi блюда. След едномесечна яровизация при 4°C растенията от всяка линия се разсаждаха в 5 реда в лека, широка 1 метър при разстояние между редовете 20 см и разстояние между линиите 50 см. Опитът е торен с амониева селитра в количество, осигуряващо 8 кг N/дка. Не са прилагани растежни регулатори и хербициди. Преди цъфтеж по-голяма част от класовете се покриваха с хартиени изолатори. От всяка линия се прибираха и анализираха главния клас и братята на 10 растения. Отчитаните биометрични показатели включваха: височина на растението, измерена от почвената повърхност до основата на класа на главния брат; брой на междувъзлията и дължина на последното междувъзлие; брой продуктивни братя; дължина на главния клас, брой класчета в главния клас; брой и маса на зърната в главния клас; брой и маса на зърната в растение; маса на 50 зърна. Броят и масата на зърната в растение са определени само през 2010 и 2011 г. като сума от стойностите на съответните показатели в главния брат и продуктивните братя. Масата на 50 зърна е определена като средна стойност от 4 проби за всяка линия, сорт и година.

3.6. Статистически методи

Резултатите са представени като средни стойности от повторенията, изчислени с програма Excel (AVERAGE). Стандартните отклонения между повторенията са изчислени с програма Excel (STDEV)/SQRT(n). MS (mean square- средно квадратично)

по групите е изчислено с Excel ANOVA: single factors. За да се установи значимостта на разликите между средните стойности беше проведен тест LSD (least significant difference – най-малка значителна разлика). Статистическата обработка на данните от лабораторните и полските експерименти включваше многофакторен дисперсионен анализ (factorial ANOVA) и t-test за достоверност на разликите между средните стойности. Използван е софтуерен пакет Statistica 7 (StatSoft 2005).

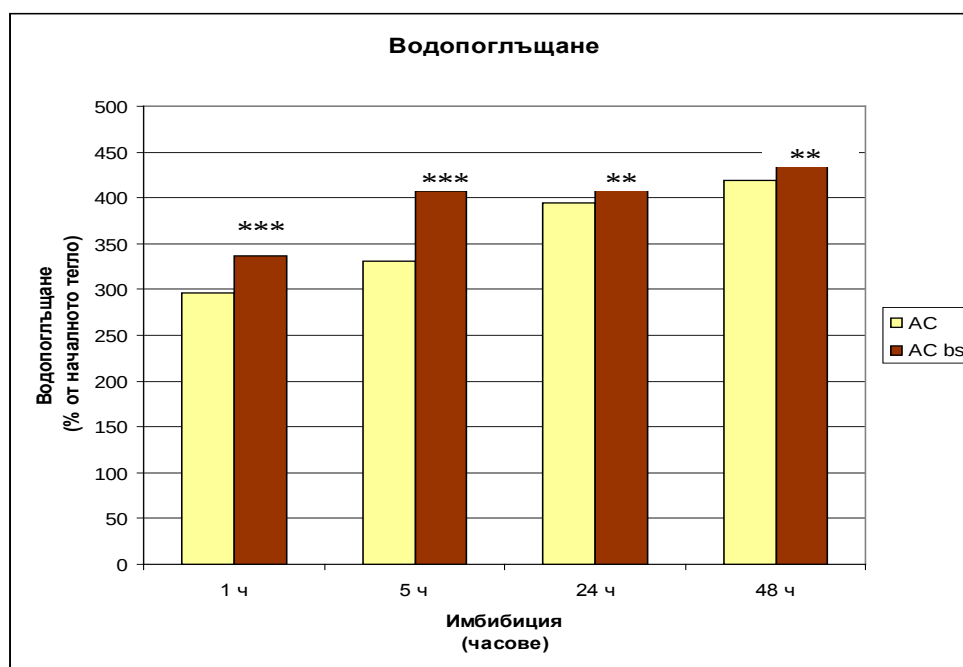
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Ефекти на мутантни гени върху покълването, растежа и някои прояви на толерантност в условия на стрес

1. Ефект на гените, контролиращи отсъствие на антоциани, върху темповете на покълване на мутанта *brown seed*.

1.1. Скорост на покълване при оптимални и стресови условия

Първата фаза в процеса на покълване е проникване на вода в семената. Нашите изследвания показаха, че от началото на имбибицията (1 до 5 часа) семената на *bs* изогенната линия поглъщат повишено количество вода в сравнение с дивия тип (Фиг. 1).



Фигура 1. Водопоглъщане при семена от *S. lycopersicum* при линия AC и нейната изогенна линия AC *bs* изразено в % на база на суха тегло на семената.

, * - разликата е статистически достоверна при $P < 0.01$ и $P < 0.001$, съответно.

Получените резултати за покълване на семената, изразени като време за покълване на 50% от семената, на всичките генотипове включени в проучването са представени в Таблица 1 (средни стойности от отделните повторения). Всички генотипове покълнаха по-бързо в сравнение с *bs* мутанта, независимо от условията на покълване.

При оптимални условия, времето необходимо за покълването на 50 % от семената на домати е в часове. Най-бързо покълнаха семената на линии АС *ah* и АС *bls*, следвани от линията АС *aw* (т.е. безантоциановите мутантни линии), което потвърждава резултатите, получени от Atanassova et al. (1997a). Около 74 часа бяха необходими за покълване на семената от дивия тип. Двойните мутантни линии, съдържащи по един ген, засягащ отсъствието на антоциани и *bs* гена, определящ кафявата обвивка на семената, покълваха значително по-бавно в сравнение с безантоциановите мутантни линии, а най-много време бе необходимо за покълване на АС *bs* (повече от 4 дни).

В условия на засоляване (120 mM NaCl), значителни различия във времето за покълване на 50 % от семената бяха отчетени между безантоциановите мутанти и безантоциановите линии с кафяви семена - първите покълват по-бързо в сравнение с двойните мутанти.

При ниски температури (13°C) тенденцията, наблюдавана при засоляване, както и при оптимални условия се запазва, но се наблюдават и две изключения. Има незначителни разлики (статистически недоказани) в скоростта на покълване между АС *ah bs* и АС *bls*. Семената на трите двойни мутантни линии покълнаха по-бързо в сравнение с дивия тип.

Резултатите, представени на Фигура 1, показват, че семената от *bs* изогенната линия поглъщат вода по-бързо от семената на дивия тип. От друга страна, резултатите, представени в Таблица 1, подкрепят една от добре познатите характеристики на *bs* мутанта: семената на линия АС *bs* покълват по-бавно в сравнение с тези на дивия тип и с безантоциановите мутанти. Получените резултати от експериментите за поемане на вода и покълване при оптимални и стресови условия са в противоречие с резултати на други автори. Различни проучвания показват, че по-бързото водно поглъщане е свързано с по-бързо покълване (Powell, 1989; Kantar et al., 1996; Atanassova et al., 1997a), а в нашите проучвания *bs* мутанта има по-бързо водно поглъщане, което обаче не води до по-бързо покълване.

Таблица 1. Влияние на *bs*, *ah*, *aw*, *bls* гените и техни комбинации (*ah bs*, *aw bs*, *bls bs*) върху времето за 50% покълване на семена домати.

Генотип	Време за 50% покълване		
	25°C (часове)	13°C (дни)	120 mM NaCl (дни)
АС	73.7 ± 1.8 с	14.7 ± 0.2 b	7.4 ± 0.2 de
АС <i>bs</i>	105.3 ± 2.4 a	18.1 ± 0.1 a	15.1 ± 0.4 a
АС <i>ah</i>	43.7 ± 1.5 e	11.2 ± 0.1 f	6.5 ± 0.2 ef
АС <i>aw</i>	60.3 ± 0.9 d	11.8 ± 0.1 ef	5.8 ± 0.1 f
АС <i>bls</i>	50.3 ± 0.9 e	12.3 ± 0.1 de	6.2 ± 0.1 f
АС <i>ah bs</i>	76.3 ± 1.5 bc	12.5 ± 0.1 d	10.1 ± 0.2 b
АС <i>aw bs</i>	81.7 ± 1.2 b	12.7 ± 0.1 cd	8.1 ± 0.1 cd
АС <i>bls bs</i>	79.3 ± 0.9 bc	13.2 ± 0.1 c	9.1 ± 0.1 bc
LSD	7.68	0.66	1.04

Представени са средните стойности и средна квадратична грешка. Различните букви след средните стойности за всеки признак и сорт показват, че разликите между всеки две линии за даден сорт са статистически достоверни при $P < 0.05$.

Egley et al. (1983) свързват тъмното оцветяване на обвивката с възпрепятстване на водно поглъщане. Нашите изследвания показаха, че в *bs* семената се увеличава количеството на поета вода, в сравнение с дивия тип, което означава, че тъмното оцветяване на обвивката не влияе върху способността за водопоглъщане на семената. Следователно, може да се предположи, че тъмният цвят на обвивката засяга характеристики, които влияят на скоростта на кълняемост, но те не се отнасят и не засягат темповете и количеството на поемането на вода в процеса на имбибиция.

1.2. Химичен състав и структура на семенната обвивка.

След третиране с Hopfner-Vorsalz реагент на семенните обвивки на АС *bs* и двойно мутантните изогенните линии домати, съдържащи по един от безантоциановите гени *ah*, *aw*, *bls* и ген за кафяв цвят на семената *bs*, се наблюдава жълто и червено-кафяво оцветяване, установено в два слоя на семенната обвивка. Оцветени в жълто са вътрешния епидермален слой и междинният паренхимен (мембранен) слой на двойните мутанти. При линията АС *bs* мембранният слой е жълто оцветен, докато вътрешният епидермален слой е оцветен червено-кафяво, което е показател за наличието на кондензирани танини. След третиране с ванилин - HCl се наблюдава наситено червено-кафяво оцветяване на вътрешния епидермален слой на семенната обвивка на АС *bs* (Фиг. 2 а), докато при трите безантоцианови мутанта с кафяви семена не беше установено такова оцветяване (Фиг. 2 б).

След третиране на контролните срези от семената на всички генотипове с абсолютен алкохол и концентрирана HCl в съотношение 2:1 беше установена негативна

реакция, което потвърждава специфичното оцветяване на кондензираните танини при изследваните обекти.



Фигура 2. Хистохимично локализиране на кондензирани танини в домати семена от а) линия AC *bs* и б) линия AC *ah bs* след оцветяване с ванилин HCl.

а) Оцветяването на вътрешния епидермален слой на обвивката показва наличие на кондензирани танини. б) Негативна хистохимична реакция за кондензирани танини.

Увеличение приблизително 63х.

Изследването на хистохимичния състав на семенната обвивка в трите двойно мутантни безантоцианови линии с кафяви семена потвърждава резултатите на Atanassova et al. (2004) относно структурата на семенната обвивка на *ah*, *aw* и *bls* мутантите, които се характеризират с отсъствие на кондензирани танини във вътрешния си епидермален слой на обвивката.

Липсата на кондензирани танини в семенната обвивка на двойните мутанти има същия ефект както при *ah*, *aw* и *bls* мутантите – отсъствието им допринася за повишаване на кълняемостта както при оптимални, така и в условия на засоляване или ниска температура. Кондензираните танини допринасят за твърдостта и здравината на клетъчната структура (Haslam, 1993). Предполага се, че тяхното отсъствие във вътрешния епидермален слой на обвивката на семената от линиите *ah*, *aw* и *bls* може би е основния фактор, който допринася за повишената пропускливост (Atanassova et al., 2004). Повишената пропускливост е предпоставка за по-бързо усвояване на водата, което впоследствие може да доведе до по-бърза кълняемост на мутантните семена.

Необходимо е да се отбележи, обаче, че при оптимални условия и засоляване, двойните мутанти покълват по-бавно в сравнение с безантоциановите мутанти, т.е. отсъствието на кондензирани танини в семенната обвивка не елиминира напълно ефекта на

кафявото оцветяване, допринасящо за по-бавно покълване на *bs 1* семената (Downie et al., 2004). Обаче липсата на кондензирани танини във вътрешния епидермален слой на обвивката на двойните мутанти ускорява кълняемостта им в сравнение с тази на *bs* мутантните семена. Това дава основание да се предположи, че отсъствието на кондензирани танини в обвивката на доматиените семена може би засяга други процеси или механизми, различни от тази на пропускливост на семенната обвивка, които са благоприятни за по-високата скорост на покълване.

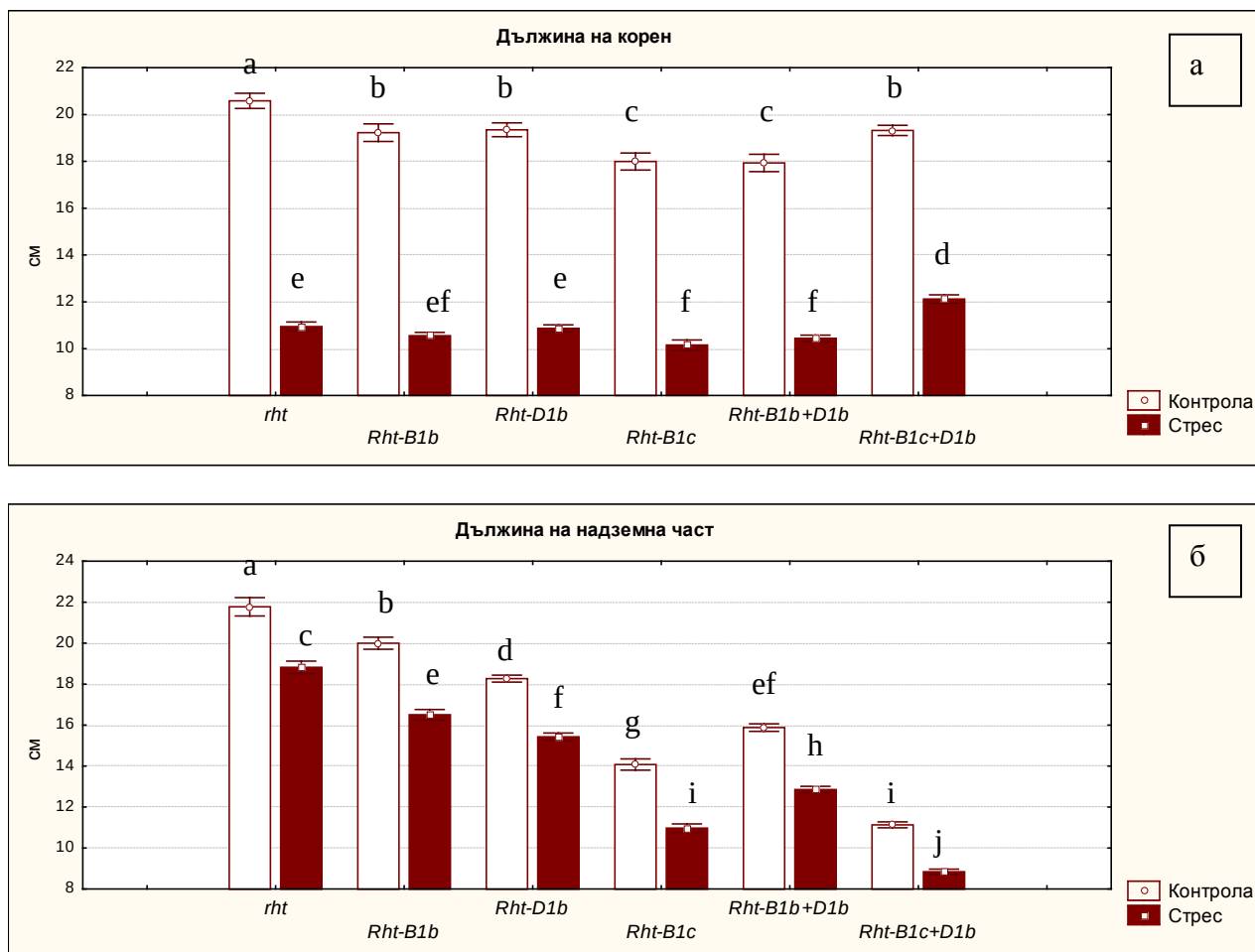
2. Ефект на *Rht* гените при *T. aestivum* върху растежа и нивото на оксидативен стрес при млади растения в условия на индуциран осмотичен стрес

2.1. Растежни параметри

Многофакторният дисперсионен анализ показва, че и трите изследвани фактора (*Rht* алел, генотипни особености на сорта и третиране) имат статистически значим ефект върху растежа на младите растения ($P < 0.001$). Третирането на 6-дневни растения с 15% PEG за период от 8 дни има силно редуциращ ефект върху дължината на корена и надземната част (Фиг. 3). Общо за всички изогенни линии дължината на корена намалява с 43%, дължината на надземната част – с 18%, а ширината на листа – с 11%.

Влиянието на *Rht* алелите върху параметрите на растежа е в зависимост от третирането. Най-слабо изразен скъсяващ ефект върху корена в сравнение с дивия тип *rht* имат гените с икономическо значение - *Rht-D1b* (6.0%) и *Rht-B1b* (6.6%), както и комбинацията *Rht-B1c+D1b* (6.1%), а най-силно изразен - *Rht-B1c* и комбинацията *Rht-B1b+D1b* (по 13%) (Фиг. 3 а). Отношението „стойност на признака при стресирани растения” / „стойност на признака при контролни растения” (в %) е мярка за толерантността на растенията към приложения стрес. Така, най-висока толерантност по отношение на дължината на корена се наблюдава при линиите с комбинация *Rht-B1c+D1b* (63%), а най-малка – при дивия алел (53%).

Дължината на надземната част значително се мени в зависимост от присъствието на *Rht* алел (Фиг. 3 б). Двата гена с икономическо значение, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, имат най-слаб ефект за намаляване дължината на надземната част в сравнение с дивия *rht* (8 и 16%, съответно, в контролите, и 13 и 18%, съответно, при стрес). Най-голям редуциращ ефект има комбинацията *Rht-B1c+D1b* (49% в контролата и 53% при стрес). С най-добра толерантност по отношение на този признак се откроява дивия ген (86%), следван от *Rht-D1b* (84%) и *Rht-B1b* (83%).



Фигура 3. Ефект на *Rht* гени върху **а)** дължина на корен; **б)** дължина на надземна част при млади пшенични растения след 8-дневно третиране с 15% PEG в хранителен разтвор на Hoagland.

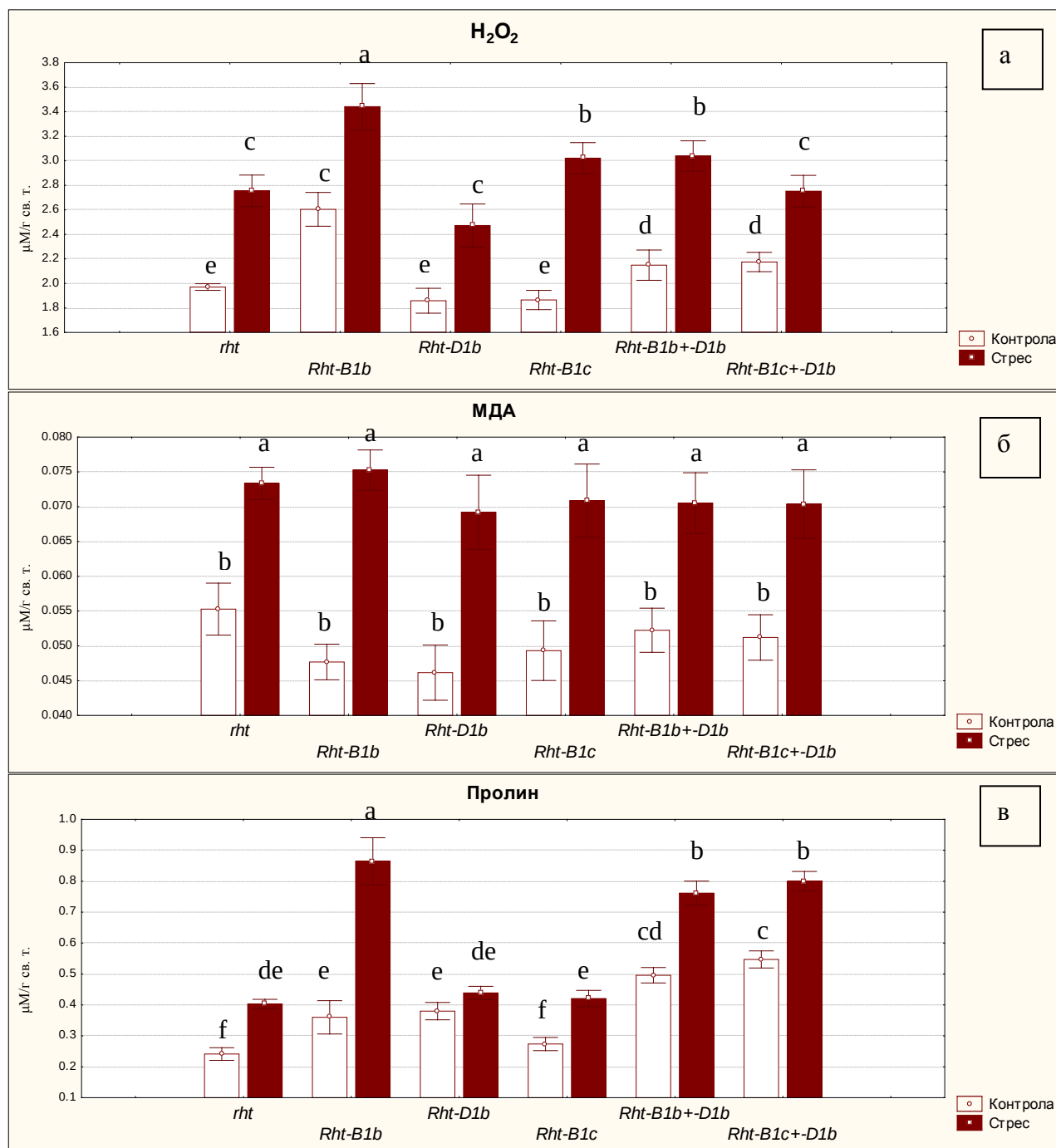
Дадени са средни стойности от 4 сорта x 15-30 повторения $\pm$ SE (n=60 за Контрола, n=120 за Стрес). Различните букви над стълбчетата показват статистически достоверни разлики при P<0.05.

2.2. Биохимични маркери за стрес

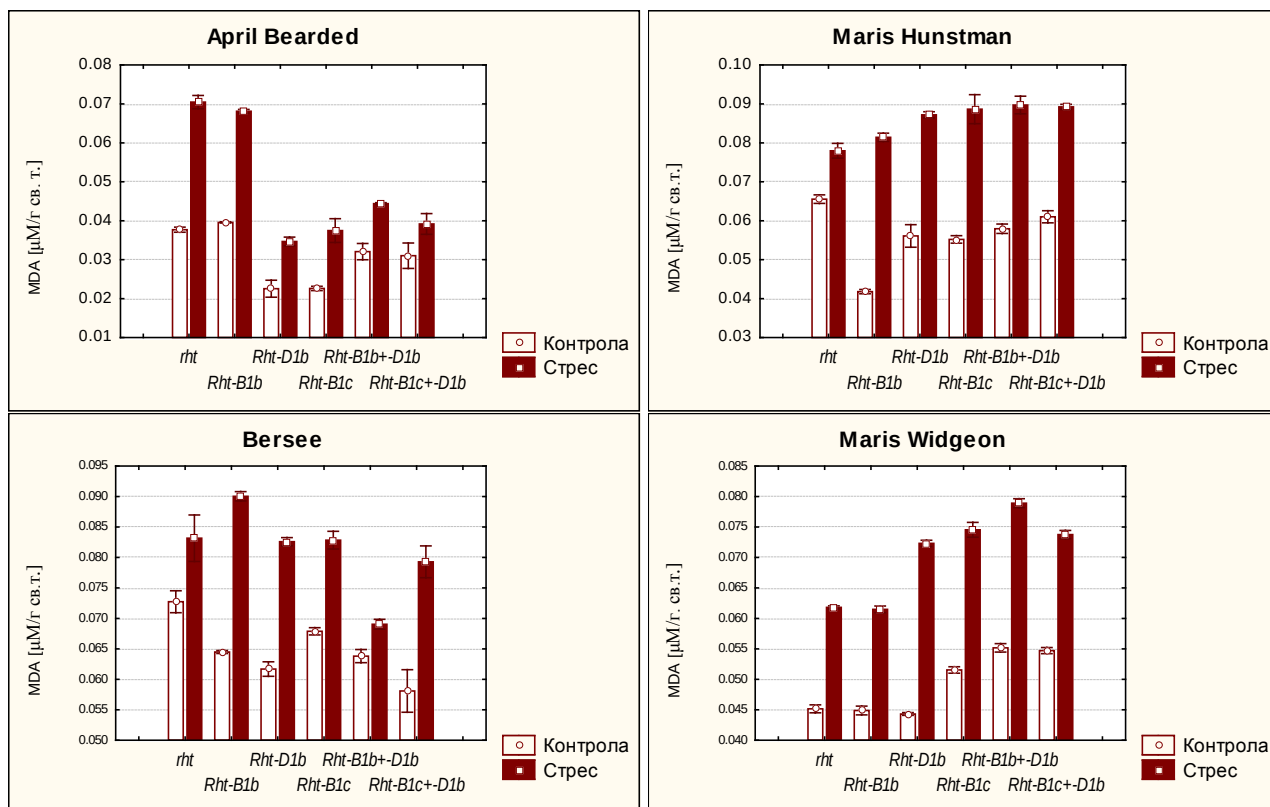
Направеният трифакторен дисперсионен анализ показва, че изследваните фактори (*Rht* алел, сорт и третиране с PEG) както и тяхното взаимодействие имат доказан ефект върху съдържанието на H_2O_2 , МДА и пролин в листа ($P < 0.001$). При всички изогенни линии се наблюдава значително нарастване в съдържанието и на трите стресови маркера след 8-дневно третиране на растенията с 15% PEG. В резултат на засушаването съдържанието на H_2O_2 в листата нараства с 39% средно за всички изогенни линии. Както в контролите, така и след стрес най-голямо съдържание на H_2O_2 е установено при линиите с алел *Rht-B1b*, а най-малко - при *Rht-D1b* (Фиг. 4 а).

Съдържанието на пролин нараства с 61% при засушените растения. Най-високи стойности в контролите са установени при двете комбинации от *Rht* гени (*Rht-B1b+D1b* и

Rht-B1c+D1b), като в условия на стрес увеличението на пролина при тези линии също е значително. Най-голямо нарастване в съдържанието на пролин спрямо контролата (140%) и най-висока абсолютна стойност след стрес са отчетени при алела *Rht-B1b* (Фиг. 4 в), а най-малко относително нарастване (16%) – при *Rht-D1b*. При линиите с алели *rht* и *Rht-B1c*, съдържанието на пролин се увеличава в по-слаба степен в сравнение с *Rht-B1b*.



Фигура 4. Ефект на *Rht* гени върху съдържанието на а) H₂O₂; б) МДА и в) пролин при млади пшенични растения след 8-дневно третиране с 15% PEG в хранителен разтвор на Hoagland. Дадени са средни стойности от 4 сорта x 4 повторения ±SE (n=16). Различните букви над стълбчетата показват статистически достоверни разлики при P<0.05.



Фигура 4-1. Ефект на сорта върху съдържанието на МДА в листа при млади пшенични растения след 8-дневно третиране с 15% PEG в хранителен разтвор на Hoagland.

Дадени са средни стойности от 4 повторения $\pm$ SE (n=4)

Малко са изследванията, които третират влиянието на *Rht* гените върху отговора на растенията при воден дефицит. При млади растения изследвания са проведени върху растежа, натрупването на биомаса, листната повърхност, водния баланс и осмотичната регулация (Blum et al. 1997, Landjeva et al. 2008a). Чрез използване на серии от изогенни *Rht* линии при различни сортове е установено, че инхибирането на растежа при воден дефицит е обратно пропорционално на размера на растенията. Така, растенията с по-голям потенциал да натрупват биомаса запазват по-добър абсолютен растеж при стресови условия, докато тези с по-малък растежен потенциал имат силно инхибиран растеж при стрес (Landjeva et al. 2008a). В същото време, именно растенията с по-малка биомаса показват по-добра толерантност (Blum et al. 1997). На базата на тези проучвания може да се допусне, че по-добрата толерантност на по-ниските растения се дължи на техните относително по-малки размери и по-бавен растеж. Нашите изследвания върху растежа на млади растения при осмотичен стрес са проведени в различна фаза от развитието на растенията в сравнение с тези по-ранни работи. Те потвърждават отчасти установеното от горните автори влияние на *Rht* гените, а именно: в условия на воден дефицит растежът на надземната част се потиска в

по-малка степен при растенията с по-голям потенциал да натрупват биомаса (дивия алел *rht* и двата алела с икономическо значение, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*), а в по-голяма степен - при по-ниските форми с малък потенциал за растеж (*Rht-B1c* и двойните комбинации). В същото време, растежът на корените е по-силно потиснат именно при линиите с по-голям потенциал за натрупване на биомаса. Вероятно това е свързано с преразпределение на асимилатите от корените към формиращите се листа.

Установяването на ефекта на *Rht* гените върху дължината на надземната част при млади растения в условия на воден дефицит е от съществено значение във връзка с тенденцията за ранно есенно засушаване, особено в Юго-Източна и Централна Европа. Разпространението на гените *Rht-B1b* и *Rht-D1b* в страните от Централна (Miazga et al. 1998; Šíř et al. 2010) и Юго-Източна Европа (Chebotar et al. 2001, Ganeva et al. 2005, Тошковић-Марић et al. 2008) прави това проучване още по-значимо. В резултат на оскъдни валежи в периода преди и след есенната сеитба (септември-октомври) е възможно значително намаляване на почвената влажност и оттук затрудняване на покълването и растежа на младите растения. Това на свой ред води до неадекватно гарниране на посева и може да се отрази негативно както на презимуването на растенията, така и на добива. Ето защо от значение при интродуциране на *Rht* гени е подборът на алели, които в по-слаба степен се влияят от този стресов фактор. Като по-удачен вариант за такива райони се посочва комбинирането им с GA-чувствителния алел *Rht8*, който не повлиява дължината на колеоптила (Landjeva et al. 2011).

Нашето изследване показва, че, освен *Rht* гените, известен ефект върху растежните отговори към индуцирания осмотичен стрес има и генотипа като цяло. Това най-вероятно се дължи на участието на голям брой гени, които по един или друг начин са асоциирани с проявите на толерантност в растението, както и на все още нехарактеризирани гени.

Сред негативните последици от засушаването на тъканно и клетъчно ниво е водния дефицит, както и свързаните с него осмотичен и оксидативен стрес. Маркери за развиващ се оксидативен стрес са генерирането на ROS (например H_2O_2) и натрупването на МДА като вторичен продукт от окислението на полиненаситените мастни киселини в клетъчните мембрани (Selote and Khanna-Chopra 2006). Нашите изследвания показват най-силен оксидативен стрес, изразен чрез нарастване съдържанието на H_2O_2 и МДА в листата, при линиите с алела *Rht-B1b*, а най-слаб – при *Rht-D1b*. Може да се допусне евентуално влияние на алела *Rht-B1b* за по-съществено активиране на клетъчните осморегулаторни механизми, за което съдим по значителния

ръст в съдържанието на пролин след осмотичен стрес, който се наблюдава при този алел. Пролинът може да функционира като молекулярен шаперон (протеин, който разпознава денатурираните полипептиди и подпомага тяхното стабилизиране) като по този начин спомага за запазване интегритета на протеините и повишаване активността на някои ензими, а така също допринася за съхраняване нормалното функциониране на клетъчните мембрани (Szabados and Savoure 2010). Редица изследвания демонстрират участието на пролина в процеси за намаляване нивото на оксидативния стрес (Smirnoff and Cumbe 1989). Очевидно е, обаче, че при линиите, носещи алела *Rht-B1b*, се запазват високи нива на H_2O_2 , независимо от високото съдържание на пролин. Изясняването на причините за това изисква допълнителни изследвания върху антиоксидантната защита. При линиите с алела *Rht-D1b* запазването на относително пониски нива на оксидативен стрес вероятно е свързано с други механизми, включително активиране на ензимни и неензимни антиоксидантни компоненти. Получените резултати не дават пълна представа за нивата на оксидативния стрес и възможното активиране на защитни механизми в растителните клетки, но са основа за позадълбочени проучвания относно това каква роля играят гените за ниско стъбло в адаптационните промени в растенията, подложени на абиотичен стрес.

II. Ефект на мутантни гени върху важни биологични и стопански качества

1. Ефект на гените *ah*, *aw* и *bls* върху показатели, свързани с хранителните и вкусови качества на доматиите

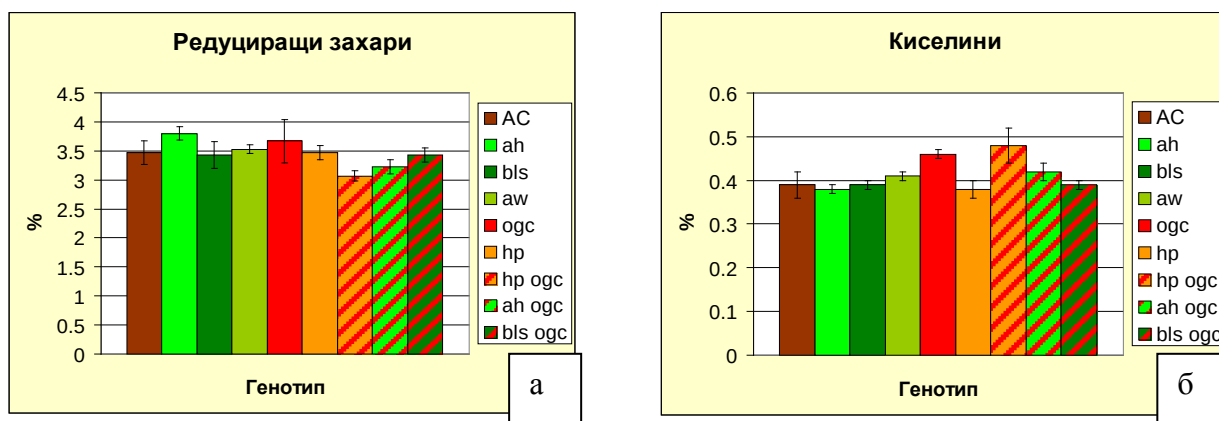
Изследванията са извършени през три различни години, всяка в три повторения. Трябва да се отбележи, че през трите години изогенните линии запазиха своя ранг по отношение на всички изследвани от нас признаци и поради тази причина са представени осреднени тригодишни данни (Табл. 2).

Известно е, че ген *high pigment* (*hp*) контролира повишено съдържание на ликопен и бета каротин (Thompson et al., 1962), а ген *old gold-crimson* (*og^c*) - повишено съдържание на ликопен в плодовете на доматиите и поради тази причина изогенни линии по тези гени бяха включени в изследванията. Включена е също така и линия АС *hphp/ og^cog^c*, тъй като е установено, че при двойния мутант съдържанието на ликопен е 2-3 пъти по-високо от това на дивия тип (Sayama, 1979).

Таблица 2. Средни стойности на показателите, определящи цвета и хранителните и вкусови качества на плодовете в изогенни линии домати.

Генотип	Ликопен (мг %)	β-каротин (мг %)	Витамин С (мг %)	Захари (%)	Киселини (%)
Ailsa Craig	5.13±0.31	1.60±0.17	32.97±0.42	3.47±0.20	0.39±0.03
AC <i>ah</i>	7.05±0.10	1.63±0.18	35.07±1.48	3.80±0.12	0.38±0.01
AC <i>bls</i>	6.30±0.04	1.87±0.12	30.53±0.74	3.43±0.23	0.39±0.01
AC <i>aw</i>	7.23±0.59	1.93±0.13	28.77±0.41	3.53±0.07	0.41±0.01
AC <i>og</i> ^c	8.48±0.39	1.30±0.15	32.63±1.17	3.67±0.37	0.46±0.01
AC <i>hp</i>	8.37±0.32	2.87±0.09	48.57±1.09	3.47±0.12	0.38±0.02
AC <i>hp og</i> ^c	11.12±0.61	2.37±0.09	39.23±1.63	3.07±0.09	0.48±0.04
AC <i>ah og</i> ^c	9.50±0.39	1.10±0.00	32.67±1.26	3.23±0.12	0.42±0.02
AC <i>bls og</i> ^c	9.52±0.42	1.30±0.10	30.30±1.67	3.43±0.12	0.39±0.01
LSD	1.179	0.37	3.52	0.54	0.05

От представената графика (Фиг. 5) се вижда, че по отношение на съдържанието на редуциращи захари (Фиг. 5 а) и киселини (Фиг. 5 б) между дивия тип линия АС и нейните изогенни линии не са установени статистически доказани разлики. Следователно, гените *ah*, *aw* и *bls* не оказват влияние върху тези показатели.



Фигура 5. Процентно съдържание на а) редуциращи захари и б)киселини в плодове при изогенни линии домати.

Дадени са средни стойности от 3 години x 9 повторения±SD (n=27)

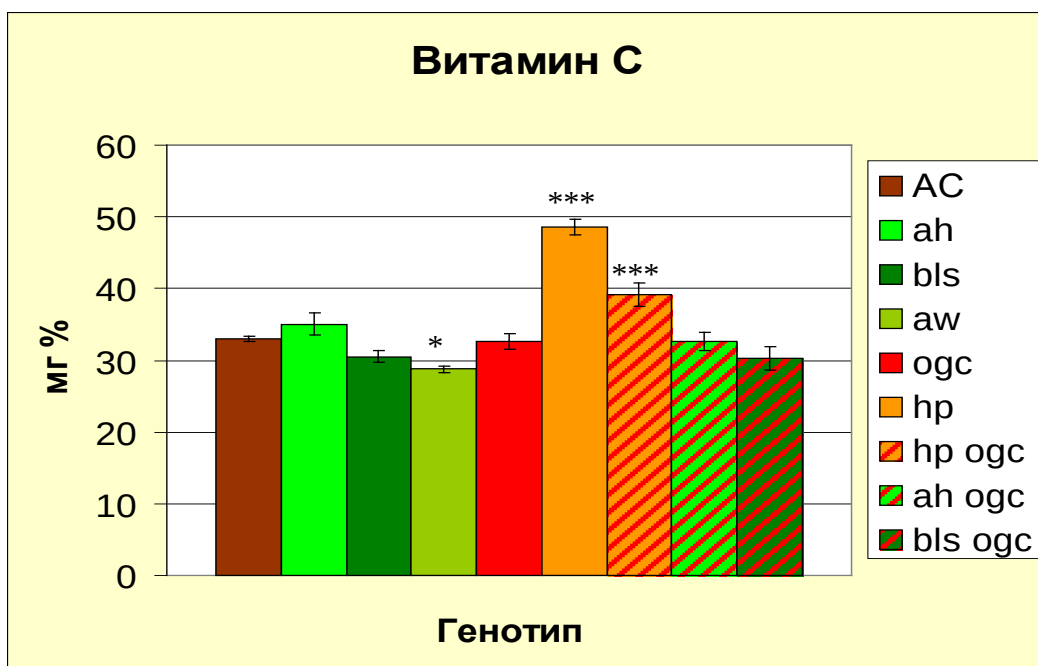
Същото се отнася и за други два показателя – витамин С (Фиг. 6) и β-каротин (Фиг. 7) с изключение на АС *aw*, при която е установено статистически доказано по-ниско съдържание на витамин С, като разликата е на границата на достоверност. Това дава

основание да се направи заключение, че отсъствието на антоциани в растителните тъкани на трите мутантни линии (за който се счита, че допринася за по-висока толерантност на растенията към неблагоприятни условия на околната среда) не оказва влияние върху биосинтезата на бета каротин, редуциращи захари, киселини и витамин С.

Резултатите от изследванията на съдържанието на β -каротин и ликопен при линиите, изогенни по отношение на гените *hp*, *og^c* и *og^c hp*, потвърждават тези на Thompson et al., (1962) и Sayama (1979). Плодовете на АС *hp* се характеризират със статистически доказано по-високо съдържание на β -каротин (Фиг. 7) и ликопен (Фиг. 8) от тези на АС, а плодовете на АС *og^c* - със статистически доказано по-високо съдържание на ликопен. Плодовете на линията, изогенна по двата гена – АС *hp og^c* имат два пъти по-високо съдържание на ликопен от дивия тип – АС и значително по-високо съдържание на ликопен от всяка една от линиите, изогенни по един от двата гена - АС *hp* and АС *og^c*.

Отсъствието на антоциани във вегетативните тъкани на мутантите АС *ah*, АС *aw* and АС *bls* не оказва отрицателен ефект върху съдържанието на ликопен. Дори напротив, съдържанието на ликопен в два от мутантите АС *ah* и АС *aw* е значително по-високо от това в плодовете на дивия тип линия АС (с около 30-35%). Това дава основание да се направи заключение, че гените *ah* и *aw* имат плейотропен ефект, който засяга хранителните качества на плодовете. Освен отсъствие на антоциани във вегетативните тъкани на растенията и отсъствие на танини в обвивката на семената, те определят и по-високо съдържание на ликопен в плодовете.

Между съдържанието на ликопен в двойните мутанти АС *ah og^c* и АС *bls og^c* и това в плодовете на АС *og^c* не са установени статистически доказани разлики, каквито са установени между АС *hp og^c* и АС *og^c*, което показва, че между гените *ah* и *og^c* както и между *bls* и *og^c*, отсъства взаимодействие, каквото се наблюдава между *hp* и *og^c* в двойния мутант АС *hp og^c*.



Фигура 6. Процентно съдържание на витамин С в плодове при изогенни линии домати.

Дадени са средни стойности от 3 години x 9 повторения $\pm$ SD (n=27). **, *** - разликата е статистически достоверна от AC (дивия ген) при $P < 0.01$ и $P < 0.001$, съответно.



Фигура 7. Съдържание на β -каротин в плодове при изогенни линии домати.

Дадени са средни стойности от 3 години x 9 повторения $\pm$ SD (n=27). **, *** - разликата е статистически достоверна от AC (дивия ген) при $P < 0.01$ и $P < 0.001$, съответно.



Фигура 8. Съдържание на ликопен в плодове при изогенни линии домати.

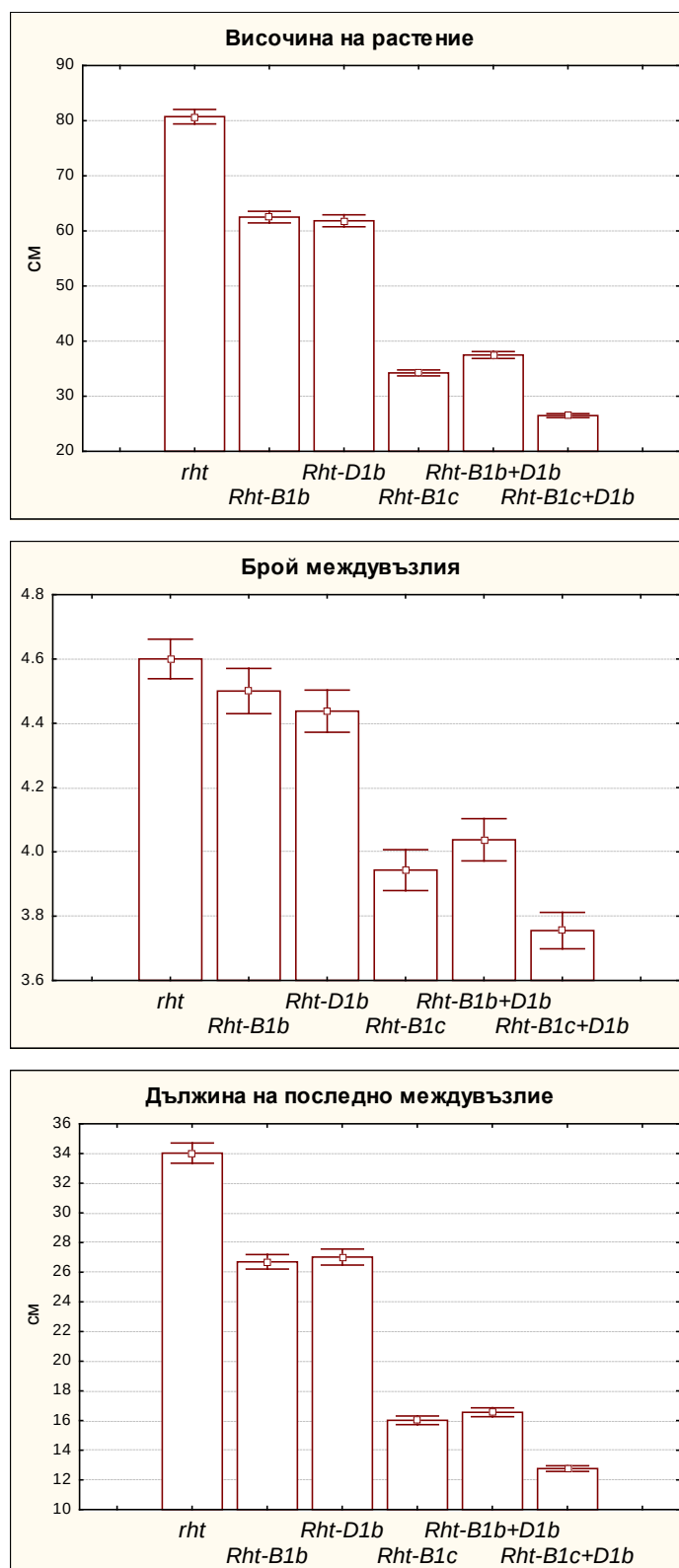
Дадени са средни стойности от 3 години x 9 повторения $\pm$ SD (n=27). **, *** - разликата е статистически достоверна от AC (дивия ген) при $P < 0.01$ и $P < 0.001$, съответно.

2. Ефект на *Rht* гените при *T. aestivum* върху височината на растенията и компонентите на добива при еко-климататичните условия в България

2.1. Височина на растенията

Анализът на данните, получени през четирите години, показва, че върху височината на растенията и признаците, свързани с продуктивността, влияние оказват и трите изследвани фактора – присъствието на мутантни *Rht* алели, генотипните особености на сорта и годината, отчитаща флуктуации в температурата и валежите ($P < 0.001$).

Ефектът на *Rht* гените върху височината на растенията при различните сортове и години е представен на Фигура 9. Подреждането на гените в зависимост от техния редуциращ ефект спрямо дивия алел *rht* е следното: $Rht-B1b \approx Rht-D1b < Rht-B1b+D1b \leq Rht-B1c < Rht-B1c+D1b$. Двата гена с икономическо значение, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, намаляват височината с 22.5 % и 23.5 %, съответно, в сравнение с високата контрола *rht*, като малката разлика в тяхното влияние е статистически недостоверна. Те имат адитивен ефект и комбинирането им води до по-голямо скъсяване на стъблото (53.4 %).

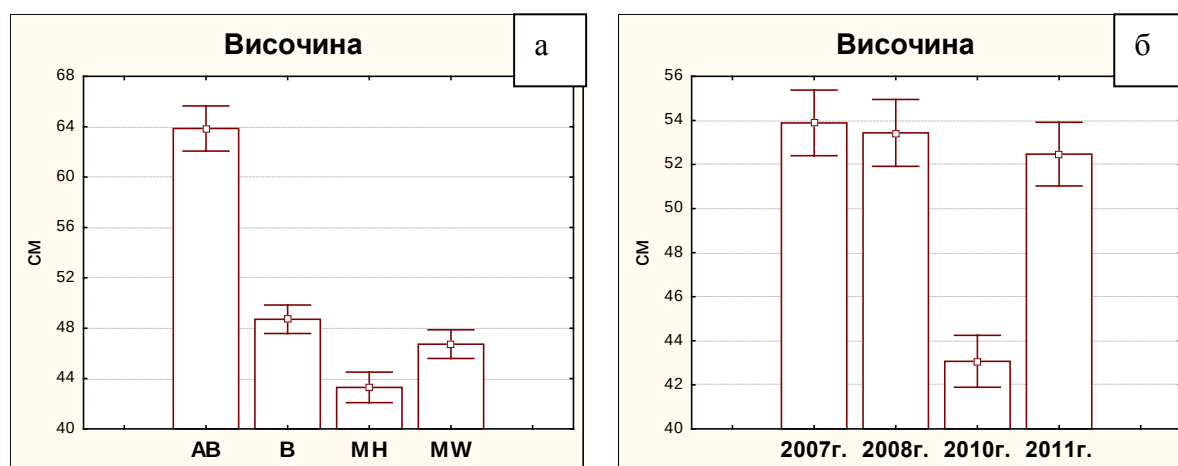


Фигура 9. Ефект на фактора ‘Мутантен алел’ върху височина на растението, брой междувъзлия и дължина на последно междувъзлие при линии, изогенни по мутантни *Rht* гени.

Дадени са средни стойности от 4 сорта x 4 години x 10 повторения $\pm$ SE (n=160).

Височината на растенията се определя както от броя на междувъзлията, така и от дължината на последното междувъзлие. Анализът на тези два признака показва, че, с малки изключения, при всички сортове и години изогенните линии, носещи гените *rht*, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, имат по-голям брой междувъзлия и по-дълго последно междувъзлие, сравнени с *Rht-B1c* и двете комбинации *Rht-B1b+D1b* и *Rht-B1c+D1b* (Фиг. 9). Редукцията в дължината на стъблото при *Rht-B1b* и *Rht-D1b* се дължи основно на по-късо последно междувъзлие, докато скъсеното стъбло при *Rht-B1c* и двете комбинации от алели се обяснява с намален брой междувъзлия и скъсено последно междувъзлие.

Височината на растенията е полигенно обусловен количествен признак. Гените за ниско стъбло *Rht-B1b* и *Rht-D1b* в хромозоми 4В и 4D са определящи, но също така са идентифицирани локуси за количествени признаци (QTL), детерминиращи варирането по този признак. С най-силно изразен ефект са районите в хромозоми 4В и 4D, чиято локализация съвпада с тази на локусите *Rht-B1* и *Rht-D1*, но освен тях са идентифицирани и голям брой QTL в други хромозоми (McCartney et al., 2005; Marza et al., 2006; Sadeque and Turner, 2010). Установени са количествени локуси с адитивни и/или епистатични ефекти (Zhang et al. 2008). Редица изследвания показват силната зависимост на височината от климатичните условия (Thomas et al., 1993; Zhang et al. 2008). В нашите изследвания най-високият сорт е АВ (Фиг.10 а), а най-ниски са растенията през 2010 г. (Фиг. 10 б).



Фигура 10. Ефект на фактора а) 'Генотип' и б) 'Година' върху височина на растенията при линии, изогенни по мутантни *Rht* гени.

Дадени са средни стойности от 6 линии x 4 години (а) или 4 сорта (б) x 10 повторения $\pm$ SE (n=240).

2.2. Компоненти на добива

Броят и масата на зърната в главния клас и в растение (сума от съответните стойности в главния клас и братята), както и масата на 50 зърна се повлияват съществено от трите фактора. Гените *Rht-B1b* и *Rht-D1b* увеличават броя на зърната в главния клас с 14% и 18%, съответно, но не влияят върху масата на зърната (Табл. 3 и Фиг. 11). Тези гени не влияят и върху броя на зърната от растение, но *Rht-D1b* намалява масата им с 18 % (Табл. 3 и Фиг. 11). Другите три гена имат силно редуциращ ефект върху броя на зърната от главен клас в реда $Rht-B1b+D1b < Rht-B1c < Rht-B1c+D1b$ (с 9, 17 и 51%, съответно); и тяхната маса (с 29, 33 и 59%, съответно). Независимо че тези алели определят формирането на по-голям брой братя, силно редуциращият им ефект върху добива от клас води до нисък добив от растение: броят на зърната от растение е намален с 20, 36 и 40%, съответно, а тяхната маса е намалена с 36, 48 и 41%, съответно, в сравнение с високите контроли (Табл. 3, Фиг. 11). Всички гени намаляват значимо масата на 50 зърна с 12 % (*Rht-B1b*) до 20% (*Rht-B1c*) (Табл. 3 и Фиг. 11).

Таблица 3. Ефект на фактора ‘Мутантен алел’ върху основни компоненти на добива при изогенни пшенични линии, носещи мутантни *Rht* гени, при четири сорта, отглеждани при климатичните условия на София, България (42°41'N, 23°19'E) през 2007, 2008, 2010 и 2011.

Мутантен алел	Брой братя	Главен клас				Едно растение		Маса 50 зърна (г)
		Дължина (см)	Брой класчета	Брой зърна	Маса на зърна (г)	Брой зърна	Маса на зърна (г)	
<i>rht</i>	4.9 b	11.0 d	20.1 c	42.3 b	0.98 a	127.3 a	2.44 a	1.23 a
<i>Rht-B1b</i>	4.8 b	11.4 bc	20.6 b	48.4 a	0.96 a	135.6 a	2.25 ab	1.08 b
<i>Rht-D1b</i>	4.9 b	11.7 ab	20.8 ab	50.0 a	0.98 a	122.9 a	2.01 b	1.03 bc
<i>Rht-B1c</i>	5.9 a	11.2 cd	21.1 a	35.3 c	0.66 b	80.9 c	1.28 c	0.98 c
<i>Rht-B1b+D1b</i>	6.2 a	11.9 a	21.1 a	38.4 c	0.70 b	102.1 b	1.56 c	1.01 bc
<i>Rht-B1c+D1b</i>	6.0 a	10.4 e	20.8 ab	20.7 d	0.40 c	76.6 c	1.44 c	1.03 bc
SED	0.25	0.17	0.21	1.94	0.05	9.78	0.2	0.04

SED – standard error of difference; различните букви показват значими разлики между средните стойности при различните *Rht* линии в една колона, $P < 0.05$.

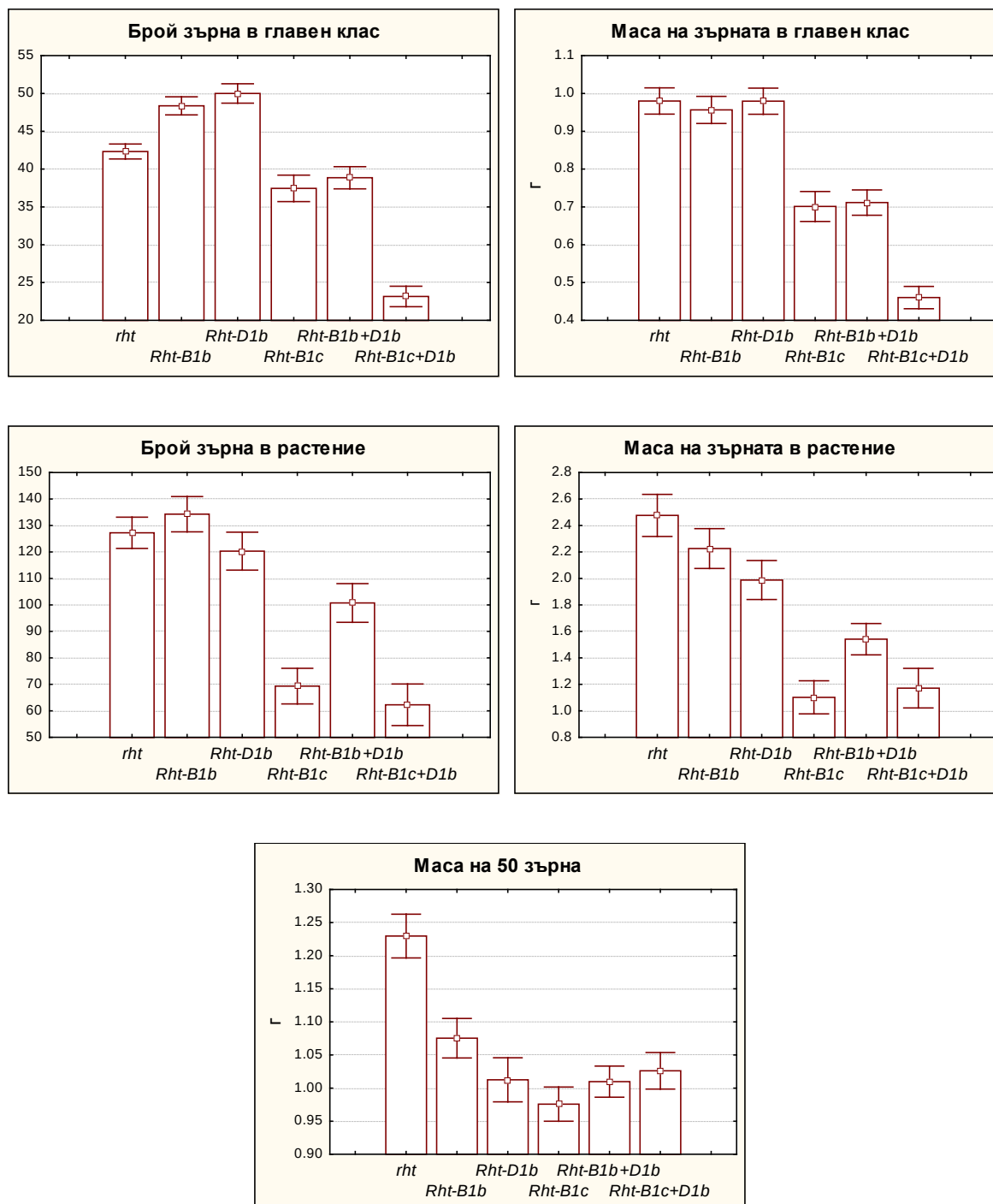
Генотипните особености на сорта и климатичните флукутации през четирите експериментални години модулират ефекта на *Rht* алелите върху компонентите на добива, което е илюстрирано на Фигура 12, показваща взаимодействието на факторите

'Мутантен алел' х 'Сорт' и 'Мутантен алел' х 'Година'. Тенденцията е добивът при линиите, носещи *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, да е съизмерим с този на дивия алел и значимо по-висок от този при *Rht-B1c* и двете комбинации, като *Rht-B1c* и комбинацията му с *Rht-D1b* имат най-ниски добиви. В рамките на отделните сортове и години се наблюдават известни различия в подреждането на алелите в зависимост от ефекта им върху компонентите на добива. Така например, *Rht-D1b* има по-голяма маса на зърната в главен клас в сравнение с *Rht-B1b* при сорта В, докато при сорт МН той е със значимо по-малък добив, а при сортовете АВ и MW двата алела имат сходен ефект. Така също, *Rht-D1b* има по-голям добив в сравнение с *Rht-B1b* през 2008 г., докато през останалите три години двата алела имат сходен ефект.

За растежа на растенията, формирането на класа и наливане на зърното от съществено значение са климатичните условия, в частност в периода на преминаване от вегетативна към репродуктивна фаза и в интервала от цъфтеж до зрялост. Температурата на въздуха и количеството на валежите и тяхното съотношение имат много голям ефект върху растежа и развитието на растението, завърза и наливането на зърното. Високите температури и засушаването намаляват добива (Ehdaie and Shakiba, 1996). В Таблица 4 са представени по години средномесечните температури и валежи за периода май-юли, през който растенията преминаваха от фаза на вегетативно развитие през фази на изкласяване и цъфтеж до зрялост.

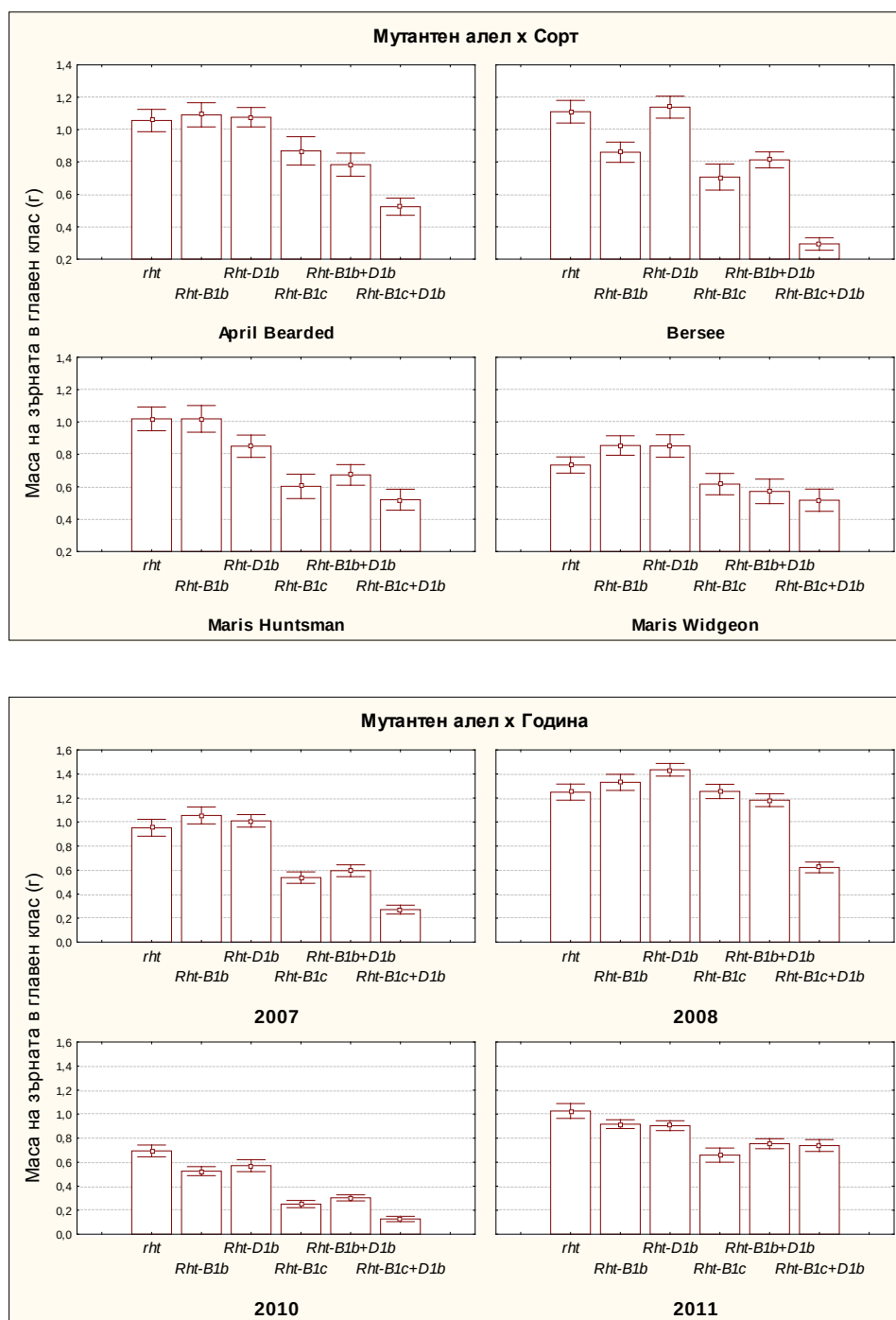
Таблица 4. Средни стойности на температурата и валежите за месеците май, юни и юли 2007, 2008, 2010 и 2011 г. Данните са получени от Националния Институт по Метеорология и Хидрология за района на ИФРГ, база 13-ти км.

Месец	2007 г.		2008 г.		2010 г.		2011 г.	
	Темп. °C	Валежи л/м ²	Темп. °C	Валежи л/м ²	Темп. °C	Валежи л/м ²	Темп. °C	Валежи л/м ²
Май	15.0	159.4	16.4	18.4	15.5	41.3	14.4	19.9
Юни	21.0	109.5	20.2	69.9	19.7	120.3	19.3	26.1
Юли	27.4	12.0	22.4	40.9	21.6	59.4	21.2	80.9



Фигура 11. Ефект на фактора ‘Мутантен алел’ върху основни компоненти на добива при линии, изогенни по мутантни *Rht* гени.

Дадени са средни стойности от 4 сорта x 4 години x 4-10 повторения $\pm$ SE (n=64 за маса на 50 зърна, n=160 за останалите признаци)



Фигура 12. Ефект на факторите ‘Мутантен алел’ x ‘Сорт’ и ‘Мутантен алел’ x ‘Година’ върху масата на зърната в главен клас при пшенични линии, изогенни по мутантни *Rht* гени.

Дадени са средни стойности от 4 години / 4 сорта x 10 повторения $\pm$ SE (n=40).

Според Law (1989) реализирането на добивния потенциал на *Rht* гените зависи преди всичко от постигането на баланс между увеличена фертилност и намалена биомаса. Този баланс се определя от климатичните условия, които в голяма степен влияят върху фертилността и наливане на зърната. По-високи температури по време на

и след фаза цъфтеж имат негативен ефект съответно върху фертилността и наливането на зърното. Количеството на валежите и почвената влага са от съществено значение за формирането на добива (Казанджиев и кол. 2011). При нашите изследвания особено ниска продуктивност беше наблюдавана през 2010 г., когато през месец юни (фаза цъфтеж при генотипи, засявани през късна зима-ранна пролет) средномесечната температура не се различаваше от другите години, дори беше малко по-ниска, но беше отчетено значително количество валежи (Табл. 4), които вероятно са препятствали опрашването и формирането на завръз. Тези особености на средата доведоха до значително намалена фертилност на класовете и по-нисък добив не само в *Rht* линиите, но и в линиите с дивия ген.

При отглеждане на тези линии в Англия и Германия при климатични условия, характерни за тези част на Европа (по-ниски температури в периода от изкласяване до прибиране на растенията), подреждането на мутантните алели в зависимост от редуциращия им ефект върху височината на растенията съвпада с наблюдаваното при нашите изследвания, като *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1b+D1b*, *Rht-B1c* и *Rht-B1c+D1b* скъсяват стъблото с 14, 17, 42, 50 и 59%, съответно (Börner et al., 1993; Flintham et al., 1997). Установеното в настоящата работа редуциране на височината в условията на по-топъл и сух климат, характерен за нашата страна, е значително по-голямо. Ние допускаме две възможни обяснения. От една страна, четирите сорта, на основата на които са изолирани изогенните линии, са зимни пшеници, които са създадени за климатичните условия на Западна Европа и нормално се засяват късно есента. Ето защо, засяването/разсаждането на растителния материал при нашите експерименти в края на зимата - началото на пролетта скъсява вегетационния период, което вероятно има известно значение за получаването на по-ниски растения. Но тъй като дивите контроли (*rht*) са отглеждани при същите условия и също така са по-ниски от съответните контроли, отглеждани в условията на по-хладен климат, то вероятно за по-силно изразения редуциращ ефект на мутантните алели (в % от дивия алел) е в сила друго обяснение. Наблюдаваното взаимодействие между високи температури и воден дефицит, от една страна, и ефекта на *Rht* гените, от друга, върху растежа и разпределението на асимилатите (Blum et al. 1997, Botwright et al. 2001) е основание да очакваме, че в условия на по-топъл и сух климат, какъвто е характерен за нашата страна, ефектите на гените за ниско стъбло ще бъдат по-силно изразени в сравнение с тези, изявени в райони с по-хладен и влажен климат.

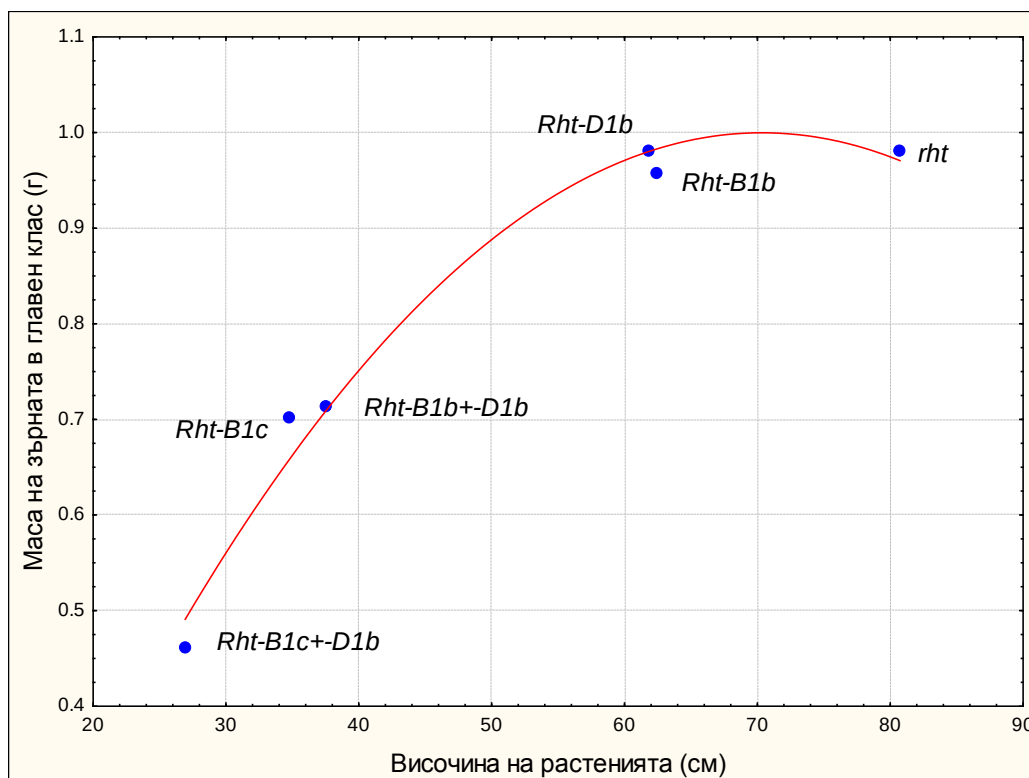
Така също, увеличението в броя на зърната от клас, получено в нашите експерименти, е подобно (при *Rht-D1b*) или по-малко (при *Rht-B1b*) в сравнение със

съобщеното от Flintham et al. (1997). Едно възможно обяснение на това наблюдение е свързано с установения положителен ефект на *Rht-B1b* върху ефективността на усвояване на почвения азот (Gooding et al. 2012, Loddo and Gooding 2012). Тъй като в статията на Flintham et al. (1997) не се посочва количеството използван азотен тор, то можем да допуснем, че до известна степен разликите в наблюдаваните ефекти на този алел може би се дължат и на разлика в нормите на азотно подхранване, използвани от авторите и от нас. В условията на България, обаче, гените *Rht-B1c* и *Rht-B1b+D1b* намаляват значително броя на зърната в класа, докато в условия на по-хладния и влажен климат в Западна Европа същите гени имат положителен ефект върху този признак. Значително по-голяма е и редукцията в масата на 50 зърна в присъствие на всички *Rht* гени, сравнена с преизчислените данни в работата на Flintham et al. (1997). Получените от нас резултати относно по-силно изразения ефект на гените за ниско стъбло върху височината и добива са в съответствие с по-ранни съобщения за по-силния ефект на водно-дефицитния и високо-температурния стрес върху височината на растенията при по-ниски генотипове в сравнение с високите контроли (Blum et al. 1997). Тези ефекти могат да се обяснят с намалена ефективност на усвояване на водата и с по-голяма чувствителност към високи температури при по-ниските генотипове (Hoogendoorn and Gale 1988; Richards, 1992). Резултатът от това е редуциран брой на фертилните цветчета, намалена жизненост на полена или нарушено охранване на зърното, което на свой ред би могло да доведе до намаляване на добива.

2.3. Продуктивността като функция от височината на растенията

За да определим по-точно зависимостта между добива от зърно и височината на растенията, създадохме модел, в който средните стойности на признака маса на зърната в главен клас от 4 сорта x 4 години x 10 повторения са съотнесени към средните стойности на височината (Фиг. 13). Съгласно модела, масата на зърната в главен клас има максимална стойност при височина на растенията около 70 см, осреднено за 4-те години и 4-те сорта. При по-високи растения тенденцията е към леко намаляване на добива, докато по-силното скъсяване на стъблото води до рязък спад в добива. Така, оптимален добив се получава при височина на растенията, заемаща междинна позиция между дивия алел *rht* (средна стойност на височината 80.7 см) и гените *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, осигуряващи скъсяване на стъблото с 22.5 и 23.5 %, съответно. Алелът *Rht-B1c* и двете комбинации драстично редуцират както височината, така и добивът от зърно. Като цяло, моделът показва висока положителна

корелационна зависимост между двата признака ($r=0.917$, $P=0.010$) и в значителна част графиката на функцията е близка до тази на линейна функция.



Фигура 13. Продуктивността (маса на зърната в главен клас, г) като функция от височината на растенията (см).

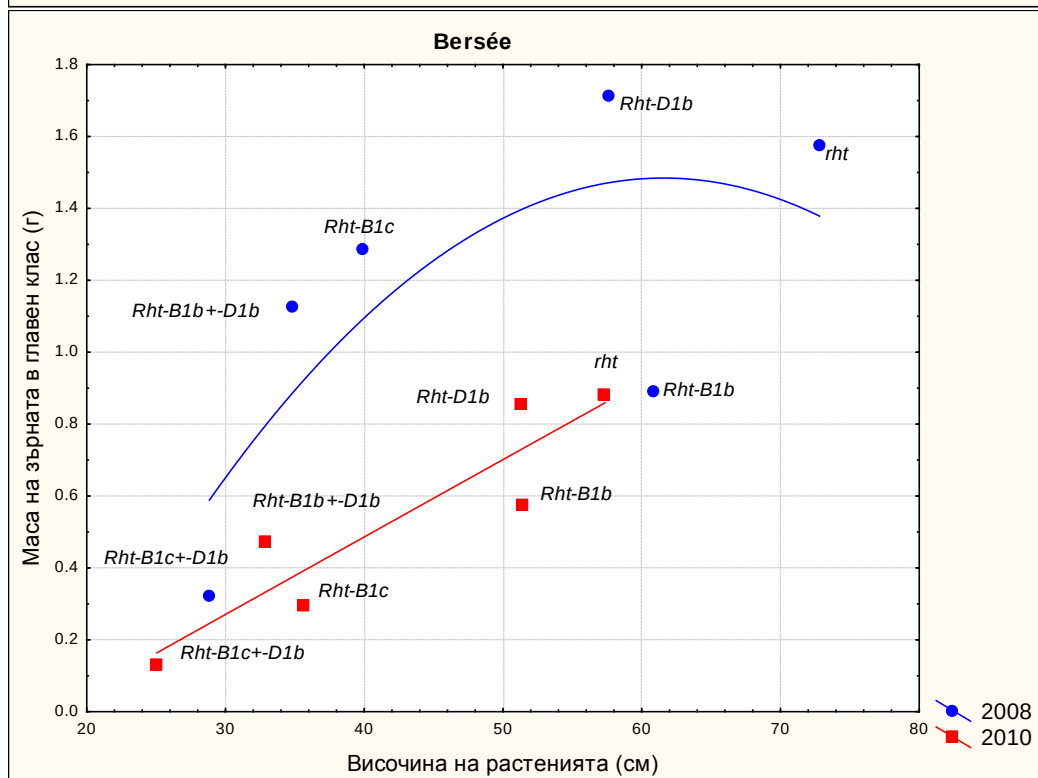
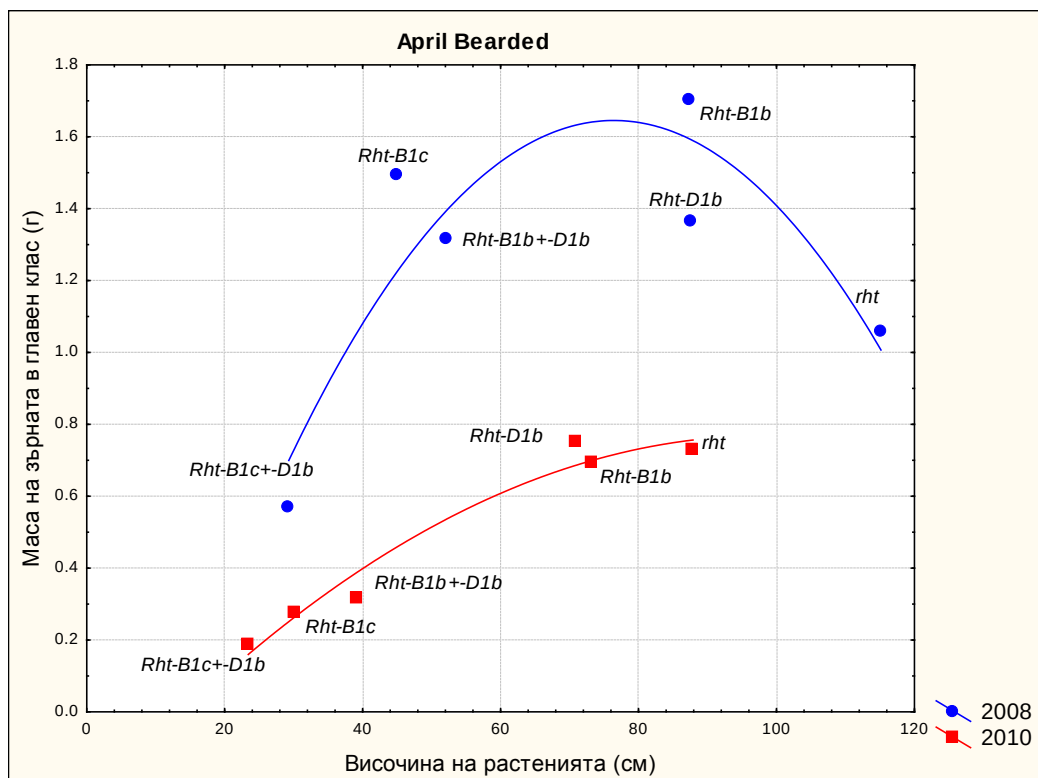
Дадени са средни стойности от 4 сорта x 4 години x 10 повторения ($n=160$).

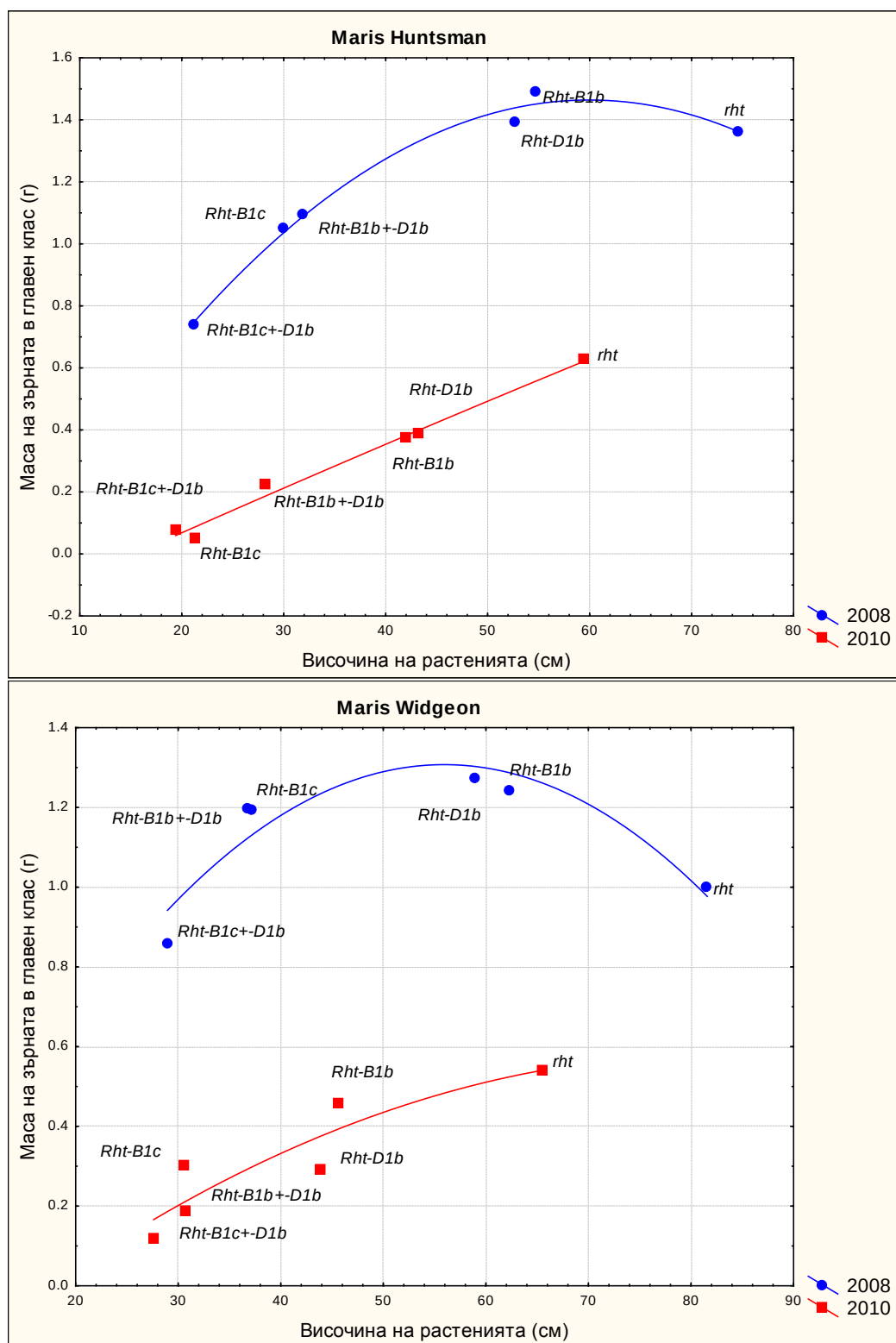
На Фигура 14 разглеждаме взаимовръзката ‘маса на зърната в главен клас’/‘височина’ поотделно за всеки сорт за две контрастни години – 2008 и 2010 г. През 2008 г. са отчетени най-високи добиви при всички линии и сортове, а 2010 г. е най-неблагоприятна. Чрез прилагане на регресионен анализ са получени полиномиални функции от втора степен за признака маса на зърната в главен клас в зависимост от височината, детерминирана от *Rht* гените (Табл. 5). През благоприятната 2008 г. между двата признака няма доказана линейна корелация, с изключение на сорта МН (Табл. 5). При високия сорт АВ (Фиг. 14) (средна височина на растенията с дивия алел *rht* 104 см, средна височина на всички линии 65 см) за получаване на оптимален добив от зърно се толерира по-силно скъсяване на стъблото от това, което предизвикват гените *Rht-B1b* и *Rht-D1b*. При по-ниските сортове В, МН и MW (средна височина на растенията с дивия алел *rht* 71-74 см, средна височина на всички линии 45-49 см), двата гена *Rht-B1b* и *Rht-D1b* осигуряват адекватно скъсяване на стъблото за получаване на оптимален или

близък до оптималния добив. През неблагоприятната 2010 г. растенията при всички сортове са по-ниски и допълнителното редуциране на височината чрез *Rht* гените води до намаляване на добива. През тази година при всички сортове корелацията между двата признака е положителна с високи стойности на корелационния коефициент (r варира от 0.90 до 0.99, при $P < 0.05$, 0.01 или 0.001, Фиг. 14). Съответно, графиките на квадратните функции, описващи зависимостта между двата признака, се доближават до права.

Таблица 5. Полиномиални функции, описващи зависимостта на масата на зърната в главен клас (y) от височината на растенията (x), детерминирана от *Rht* гените и линейни корелационни зависимости (r , корелационен коефициент по Pearson при вероятност P)

Сорт	Година	$y=f(x)$	r, p
April Bearded	2008	$y = -0.843 + 0.0651x - 0.0004x^2$	$r=0.336, P=0.510$
	2010	$y = -0.279 + 0.0212x - 0.0001x^2$	$r=0.971, P=0.0012$
Bersée	2008	$y = -1.6874 + 0.103x - 0.0008x^2$	$r=0.642, P=0.169$
	2010	$y = -0.3789 + 0.0217x - 1.9153E^{-6}x^2$	$r=0.918, P=0.0098$
Maris Huntsman	2008	$y = -0.2512 + 0.0572x - 0.0005x^2$	$r=0.847, P=0.033$
	2010	$y = -0.2284 + 0.0151x - 1.2997E^{-5}x^2$	$r=0.993, P=0.00007$
Maris Widgeon	2008	$y = -0.2645 + 0.0562x - 0.0005x^2$	$r=0.164, P=0.756$
	2010	$y = -0.3553 + 0.0227x - 0.0001x^2$	$r=0.897, P=0.015$
Общо:	2008 и 2010	$y = -0.3366 + 0.038x - 0.0003x^2$	$r=0.917, P=0.0101$





Фигура 14. Продуктивността (маса на зърната в главен клас, г) като функция от височината на растенията при четири сорта пшеница през две години (2008 – благоприятна; 2010 – неблагоприятна).

Дадени са средни стойности от 10 повторения (n=10).

Предложеният модел дава възможност да се предвиди какъв ефект върху добива от зърно би имало въвеждането на ген за ниско стъбло в даден сорт. Този ефект ще

зависи, от една страна, от височината на сорта, в който *Rht* генът се интродуцира, като при по-високите сортове е необходимо да се въведе ген с по-силен редуциращ ефект върху височината за получаване на оптимален добив. И обратно, при ниските сортове следва да се избере ген с по-слаб ефект върху височината. От друга страна, трябва да се има предвид, че климатичните условия имат значение за характера на взаимовръзката височина/добив. Ето защо, при създаване на сортове, предназначени за отглеждане при неблагоприятни условия, следва да се въвеждат *Rht* гени с по-слаб ефект върху стъблото за получаване на добиви, близки до възможно максималните.

Според предложения модел в условията на нашата страна оптималната височина, при която може да се реализира продуктивния потенциал на *Rht* алелите в изследваните сортове е в границите от 60 до 80 см. За сравнение, при същите сортове и изогенни линии, отглеждани в Англия и Германия тази оптимална височина е между 70 и 100 см (Flintham et al., 1997). Интерес представлява прилагането на модела при сортове, които са създадени и се отглеждат при специфичните за България климатични условия.

Представените резултати са от значение за селекционната практика при пшеницата за оптимизиране на взаимозависимостта 'височина на растенията' - 'добив' в райони, характеризиращи се с високи температури и засушаване в определени периоди от вегетационния период на растенията, каквито са страните от Южна и Юго-Източна Европа. Според Worland et al. (1998) двата основни гена *Rht-B1b* и *Rht-D1b* не са подходящи за въвеждане в такива райони поради тяхната чувствителност към посочените два стресови фактора, особено в периода на поникване и по-късно по време на цъфтеж. В тези райони по-ефективни биха били гени с по-слаба мощ (напр. GA-чувствителния ген *Rht8*) или комбинация с други гени, контролиращи височината и продуктивността. В съгласие с това предположение, по-ранни изследвания показаха, че селекцията на пшеница в България, насочена към повишаване на продуктивността, очевидно е довела до преференциално интродуциране на гена *Rht8* (Ganeva et al. 2005). В сортовете, създадени след 1990, този ген все по-често се оказва в комбинация с алели в локуса *Rht-B1*, предимно алела *Rht-B1d* и по-рядко *Rht-B1b*. По този начин българските селекционери очевидно са успели да постигнат едно отлично съчетание на агрономическите предимства на двата вида *Rht* гени (Landjeva et al. 2011). От една страна, генът *Rht8* дава по-дълъг колеоптил и по-висока жизненост на младите растения (Rebetzke et al. 2007) и съответно осигурява по-добро покълване, поникване и гарниране на посева, което е особено значимо за райони като България с ранно есенно засушаване. От друга страна, алелите в локуса *Rht-B1* имат по-висок продуктивен

потенциал. С други думи, съчетаването *Rht8* с *Rht-B1* алели се оказва подходяща комбинация за специфичните за България климатични условия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от изследванията, представени в дисертационния труд дават основание да се направи заключение, че установяването на плейотропен ефект на гени с ясно фенотипно изражение може да бъде значителен потенциал за ускоряване и улесняване на генетичното подобряване на две от най-важните не само за България, но и в световен мащаб култури – домати и пшеница. Установен е плейотропен ефект на мутантни гени при *S. lycopersicum* и *T. aestivum*, засягащ важни биологични и стопански признаци.

Безантоцианови мутантни гени *ah*, *bls* и *aw* проявяват плейотропен ефект при мутанта *bs*, контролиращ тъмния цвят на доматените семена и бавно покълване, както и нисък працен на покълване. Линиите, хомозиготни по един ген, контролиращ отсъствието на антоциани и *bs* гена, покълват значително по-бавно от безантоциановите мутантни линии, но по-бързо от дивия тип (AC *bs*) както при оптимални условия, така и при условия на стрес (ниски температури и засоляване). Изследването на хистохимичния състав на семенната обвивка в трите двойно мутантни безантоцианови линии с кафяви семена показва отсъствие на кондензирани танини във вътрешния епидермален слой на обвивката, признак, който се контролира от гените *ah*, *bls* и *aw*.

Беше установен плейотропен ефект на два от изследваните безантоцианови мутантни гени *ah* и *aw*, върху някои показатели, засягащи хранителните качества на плодовете. Освен отсъствие на антоциани във вегетативните тъкани на растенията, те контролират по-високо съдържание на ликопен в плодовете.

При нашите изследвания за определяне ефекта на *Rht* гените при *T. aestivum* върху растежа на млади растения в отговор на индуциран осмотичен стрес установихме, че растежът на надземната част е по-слабо инхибиран при генотипове с по-голям потенциал да натрупват биомаса, а в по-голяма степен - при по-ниските форми с малък потенциал за растеж. В същото време, при всички линии растежът на корените е по-силно потиснат от този на надземната част, в най-голяма степен именно при линиите с по-голям потенциал за натрупване на биомаса.

При всички *Rht*-изогенни линии се наблюдава значително нарастване в съдържанието на трите стресови маркера (H_2O_2 , МДА и пролин) в условия на оксидативен стрес. Както в контролите, така и след стрес най-голямо съдържание на

H₂O₂ е установено при линиите с алел *Rht-B1b*, а най-малко - при *Rht-D1b*. Линиите с алел *Rht-B1b* показват тенденция за най-високо съдържание на МДА в условия на стрес, както и най-голямо нарастване спрямо нестресираните контроли. При линиите с алел *Rht-B1b* е установено и най-голямо нарастване в съдържанието на пролин спрямо контролата и най-висока абсолютна стойност след стрес, докато при *Rht-D1b* се наблюдава най-малко относително нарастване. Обобщено, най-силен оксидативен стрес, изразен чрез нарастване съдържанието на H₂O₂, МДА и пролин в листата, се установява при линиите с алела *Rht-B1b*, а най-слаб – при *Rht-D1b*. Такива проучвания се провеждат за първи път при пшеницата и са важен етап за изясняване ролята на *Rht* гените в обуславяне на толерантност към абиотичен стрес.

Редуциращият ефект на гените за ниско стъбло върху височината на растенията при всички сортове и години, установен за климатичните условия на България, е в реда: $Rht-B1b \approx Rht-D1b < Rht-B1b + D1b \leq Rht-B1c < Rht-B1c + D1b$, като редукцията в дължината на стъблото при *Rht-B1b* и *Rht-D1b* се дължи основно на по-късо последно междувъзлие, докато скъсеното стъбло при *Rht-B1c* и двете алелни комбинации се свързва както със скъсено последно междувъзлие, така и с намален брой междувъзлия. Гените с икономическа значимост, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, увеличават броя на зърната в главния клас, но не влияят върху масата на зърната.

Установените ефекти на *Rht* гените върху височината и продуктивността на пшеницата при климатичните условия на България се различават от тези, получени при аналогични изследвания, проведени в условия на по-хладен и влажен климат. Така, в условията на България проучваните *Rht* гени имат по-силно изразен редуциращ ефект върху височината. Гените *Rht-B1b* и *Rht-D1b* в по-слаба степен увеличават добива, а останалите имат редуциращ ефект върху добива, докато същите алели го увеличават при хладен и влажен климат. Тези резултати показват силна зависимост на височината и продуктивността при пшеницата от най-малко три фактора: ген за ниско стъбло, генотип и климатични условия. От друга страна, наблюдаваните ефекти на отделните алели на *Rht* гените, детерминиращи различна степен на скъсяване на стъблото, върху продуктивността от клас и растение, бяха база за създаване на модел, описващ зависимостта на зърнения добив от височината на растенията. Този модел показва, че максимален зърнен добив при изследваните сортове се осигурява от растения с височина около 70 см. Тази зависимост се модулира от генотипните особености на сорта, в който са интродуцирани гените за ниско стъбло, и от ежегодните флукуации в климата в критични фази от вегетацията. Предложеният модел може да се използва за предвиждане на ефекта от въвеждането на ген за ниско стъбло в даден висок сорт

съобразно неговата височина, други генотипни особености и в зависимост от климатичните условия във важни вегетационни фази.

ИЗВОДИ

1. Плейотропният ефект на безантоциановите гени *ah* (*Hoffmann's anthocyaninless*), *aw* (*anthocyanin without*) и *bls* (*baby lea syndrome*), изразяващ се в отсъствие на кондензирани танини в обвивката на семената, в резултат на което те покълват значително по-бързо от семената на дивия тип при оптимални и стресови условия, се проявява и при комбинацията на тези мутантни гени с мутацията *brown seed*, характеризираща се със забавено покълване на семената.

2. Гените *ah* и *aw* имат плейотропен ефект, засягащ хранителните качества при домати. Освен отсъствие на антоциани във вегетативните тъкани на растенията и друг установен плейотропен ефект, контролиращ отсъствие на кондензирани танини в обвивката на семената, те контролират повишено съдържание на ликопен в плодовете.

3. Трите безантоцианови гена *ah*, *aw* и *bls* не оказва влияние върху съдържанието на киселини, редуциращи захари и витамин С в плодовете на домати.

4. Гиберелин-нечувствителните *Rht* гени за ниско стъбло при пшеницата влияят съществено върху степента на инхибиране на растежа на млади растения и промените в нивото на оксидативен стрес при индуциран воден дефицит.

4.1. Растежът на корените е потиснат най-слабо при ниските генотипове (*Rht-B1c+D1b*), а растежът на надземната част - при високите генотипове (*rht*, *Rht-B1b* и *Rht-D1b*).

4.2. Най-голямо увеличение в съдържанието на стресови маркери (H_2O_2 , МДА и пролин) в листа е установено при линиите, носещи алела *Rht-B1b*, а най-малко – при линиите с алела *Rht-D1b*.

5. При климатичните условия на София, България (42°41'N, 23°19'E) алелите *Rht-B1b* и *Rht-D1b* скъсяват стъблото с 23 %, а комбинацията им - с 53 %; алелът *Rht-B1c* редуцира височината на растенията с 57 %, а при комбиниране с *Rht-D1b* - с 67 %.

6. Алелите *Rht-B1b* и *Rht-D1b* увеличават броя на зърната от клас с 14 и 18%, съответно, в сравнение с дивия тип алели. Останалите алели определят формирането на по-голям брой братя, но силно редуцират броя и масата на зърната от клас и от растение.

7. Добивът, представен като маса на зърната от клас, е в зависимост от височината на растенията, детерминирана от *Rht* гените. При изследваните сортове пшеница и при климатичните условия на София, България, оптималната височина на растенията за получаване на максимална продуктивност е в границите 60-80 см.

8. Степента на изява на плейотропните ефекти на *Rht* гените върху височината на растенията и компонентите на добива, както и взаимовръзката 'височина' - 'маса на зърната от клас' зависят от генотипните особености на сорта и от климатичните условия.

ПРИНОСИ

1. Установен е втори плейотропен ефект на два безантоцианови гена - *ah* (*Hoffmann's anthocyaninless*), и *aw* (*anthocyanin without*). Освен отсъствие на кондензирани танини в обвивката на семената, те контролират и повишено съдържание на ликопен в плодовете. Това обогатява възможностите за генетичното подобряване на домати по отношение на едно от най-важните хранителни вещества при тази зеленчукова култура.

2. Доказано е, че плейотропният ефект на гените *ah* (*Hoffmann's anthocyaninless*), *aw* (*anthocyanin without*) и *bls* (*baby lea syndrome*), изразяващ се в отсъствие на кондензирани танини в обвивката на семената, както и неговите последствия – (значително по-бързо покълване на мутантните семена от тези на дивия тип при оптимални и стресови условия), се проявява и в мутантен генотип *brown seed*, характеризиращ се със забавено покълване и нисък процент на кълняемост на семената.

3. Установено е, че трите мутантни безантоцианови гена – *ah*, *aw* и *bls*, които намират широко приложение като маркерни гени за установяване на хибридна чистота при хибридни семена от домати, не оказват влияние върху съдържанието на важни за хранителните и вкусови качества показатели в плодовете на домати - киселини, редуциращи захари и витамин С.

4. За първи път е изследвано влиянието на гибберелин-нечувствителни *Rht* гени за ниско стъбло при пшеницата върху нивото на оксидативен стрес, развиващ се при воден дефицит. Установените различия в ефекта на тези гени върху съдържанието на основни стресови маркери в листа са от значение за изясняване ролята на *Rht* гените в адаптационните процеси при растенията в отговор на стрес.

5. Установени са ефектите на три алела на гибберелин-нечувствителни *Rht* гени при пшеницата върху височината на растенията и компонентите на добива при еко-

климатичните условия на София, България. Предложен е модел, представящ продуктивността като функция от височината на растенията. Моделът може да се използва за оптимизиране скъсяването на стъблото чрез въвеждане на подходящи по сила *Rht* гени за постигане на възможно максимален добив в зависимост от потенциала на сорта и климатичните условия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казанджиев В., Георгиева В., Жолева Д., Ценов Н., Руменина Е., Филчев Л., Димитров П., Желев Г. 2011. Измененията и колебанията на климата и условията за производство на зимна пшеница в североизточна България. *Field Crop Studies*, 7:195-220.
2. Alexandrov V., Schneider M., Koleva E., Moisselin J.M. 2004. Climate variability and change in Bulgaria during the 20th century. *Theoretical and Applied Climatology*, 79:133-149.
3. Atanasova B., Shtereva L., Molle, E. 1997 a. Effect of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Seed germination under optimal conditions. *Euphytica*, 95:89-98.
4. Atanasova B., Shtereva L., Georgieva Y., Balatcheva E. 2004. Study on seed coat morphology and histochemistry in three anthocyaninless mutants in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in relation to their enhanced germination. *Seed Science and Technology*, 32:79-90.
5. Bates L.S., Waldron R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline in water stress studies. *Plant Soil*, 29:205-207.
6. Blum A., Sullivan C. Y., Nguyen H. T. 1997. The effect of plant size on wheat response to agents of drought stress. II. Water deficit, heat and ABA. *Austr. J Plant Physiol.*, 24:43-48.
7. Börner A., Worland A.J., Plaschke J., Erika Schumann & Law C.N. 1993. Pleiotropic effects of genes for reduced height (*Rht*) and day-length insensitivity (*Ppd*) on yield and its components for wheat genes in middle Europe. *Plant Breeding*, 111: 204-216.
8. Botwright, T., Rebetzke, G., Condon, T. and Richards, R. 2001. The effect of *rht* genotype and temperature on coleoptile growth and dry matter partitioning in young wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:417-423.
9. Сакмак I. and Horst W.J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) *Physiol. Plant.*, 83:463-468.
10. Chebotar S.V., Korzun V.N., Sivolap Yu M. 2001. Allele distribution at locus WMS261 marking the dwarfing gene *Rht8* in common wheat cultivars of Southern Ukraine. *Russian J Genet*, 37:894-898.
11. Click D. (ed.) 1971. *Methods of biochemical analysis*. C, Acad. Press, London: 17.
12. Downie A.B., Dirk L.M.A., Xu Q., Drake J., Zhang, D., Dutt M., Butterfield A., Geneve R.R. Corum J.W., Lindstrom K.G., Snyder, J.C. 2004. A physical, enzymatic, and genetic characterization of perturbations in the seeds of the *brown seed* tomato mutants. *Journal of Experimental Botany*, 399: 961-973.
13. Egley G.H., Paul R.N.Jr., Vaughn K.C., Duke S.O. 1983. Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Planta*, 157: 224-232.
14. Ehdaie B. and Shakiba M.R. 1996. Relationship of internode-specific weight and water-soluble carbohydrates in wheat. *Cereal Res Commun*, 24:61-67.
15. Flintham E., Börner A., Worland A., Gale M. 1997. Optimizing wheat grain yield effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J Agric Sci Cambridge*, 128:11-25.
16. Ganeva G., Korzun V., Landjeva S., Tsenov N., Atanasova M. 2005. Identification, distribution and effects on agronomic traits of the semi-dwarfing *Rht* alleles in Bulgarian common wheat cultivars. *Euphytica*, 145:305-315.
17. Gooding M., Addisu M., Uppal R.K., Snape J.W., Jones H.E. 2012. Effect of wheat dwarfing genes on nitrogen-use efficiency. *The Journal of Agricultural Science*, 150:3-22.
18. Haslam E. 1993. Polyphenolic phenomena. In *Polyphenol Complexation*, (ed. A. Scalbert), pp. 23-31, INRA, Paris.
19. Hoogendoorn J. and Gale M.D. 1988. The effects of dwarfing genes on heat tolerance in CIMMYT germplasm. In 'Cereal Breeding Related to Integrated Cereal Production'. (Eds ML Jorna and LAJ Sloodmaker), pp. 61-66. (Wageningen, The Netherlands: PUDOC).

20. Kantar F., Pilbeam C.J. and Hebblethwaite P.D. 1996. Effect of tannin content of faba bean (*Vicia faba*) seed on seed vigour, germination and field emergence. *Annals of Applied Biology*, 128:85-93.
21. Landjeva S., Korzun V., Stoimenova E., Truberg B., Ganeva G., Börner A. 2008 a. The contribution of the gibberellin-insensitive semi-dwarfing (*Rht*) genes to genetic variation in wheat seedling growth in response to osmotic stress. *J. Agric. Sci.*, 146:275-286.
22. Landjeva S., Karceva T., Korzun V., Ganeva G. 2011. Seedling growth under osmotic stress and agronomic traits in Bulgarian semi-dwarf wheat – comparison of genotypes with *Rht8* and/or *Rht-B1* genes. *Crop and Pasture Science*, 62(12): 1017-1025.
23. Law C.N. 1989. Plant genetics and breeding research. *AFRC Plant Science Research Programme Annual Report*, 1-3.
24. Loddo S. and Gooding M. 2012. Semi-dwarfing (*Rht-B1b*) improves nitrogen-use efficiency in wheat, but not at economically optimal levels of nitrogen availability. *Cereal Research Communications*, 40:116-121.
25. Manuelyan H., Yordanov M. 1967. Improved method of chromatographic separation of carotene in tomatoes. *Hort. Vitic. Sci.*, 4(2):53-58. (in Bulgarian).
26. Marza F., Bai G.H., Carver B. F., Zhou W.C. 2006. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 x Clark. *Theor Appl Genet*, 112: 688–698.
27. Maxon Smith J.W. and Ritchie D.B. 1982. A collection of near isogenic lines of tomato. *Research tool of the future?* *Plant Mol. Biol. Newsletter*, 3:20-25.
28. McCartney C.A., Somers D.J., Humphreys D.G., Lukow O., Ames N., Noll J., Cloutier S., McCallum B.D. 2005. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 × ‘AC Domain’. *Genome*, 48:870–883.
29. Miazga D., Kowalczyk K., Worland A. 1998. Identification of GA-insensitive *Rht* genes in Polish varieties and breeding lines of common wheat. *EWAC Newsl.*, 10:114–117.
30. Morgan J.A., LeCain D.R., Wells R. 1990. Semidwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Science*, 30:602-608.
31. Pongraz G. 1971. Neue Potentiometrische Bestimmungsmethode für Ascorbinsäure und deren Verbindungen. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 253:271-274.
32. Powell A.A. 1989. The importance of genetically determined seed coat characteristics to seed quality in grain legumes. *Annals of Botany*, 63:169-195.
33. Richards R.A. 1992. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. II Growth, water use and water use efficiency. *Aust. J. Agric. Res.*, 43:529-539.
34. Rebetzke G.J., Richards R.A., Fettel N.A., Long M., Condon A.G., Forrester R.I., Botwright T.L. 2007. Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat. *Field Crops Research*, 100:10–23.
35. Sadeque A. and Turner M.A. 2010. QTL Analysis of Plant Height in Hexaploid Wheat Doubled Haploid Population. *Thai Journal of Agricultural Science*, 43(2):91-96.
36. Sayama H. 1979. Morphological and physiological effects associated with the crimson (*ogc*), high pigment (*hp*) and other chlorophyll intensifier genes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mil.) (PhD dissertation). West Lafayette, IN: Purdue University
37. Selote D. S. and Khanna-Chopra R. 2006. Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiol. Plant.*, 127:494-506.
38. Sergiev I., Alexieva V., Karanov E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 51:121–124.
39. Šíp V., Chrpová J., Žofajová A., Pánková K., Užík M., Snape J.W. 2010. Effects of specific *Rht* and *Ppd* alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe. *Euphytica*, 172: 221-233.
40. Smirnoff N. and Cumbes Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28:1057–1060.
41. StatSoft (2005) *Statistica 7* (StatSoft Inc.: Tulsa, OK). Available at www.statsoft.com/textbook/
42. Szabados L. and Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15: 89–97.
43. Thomas B., Schaalje G. B., Grant M. N. 1993. Survival, height and genotype by environment interaction in winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 73(2):417-427.
44. Thompson A.E., Hepler R.W., Kerr E.A. 1962. Clarification of the inheritance of high total carotenoid pigments in the tomato. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 81:610-616.
45. Tošović-Marić B., Kobiljski B., Obreht D., Vapa Lj. 2008. Evaluation of wheat *Rht* genes using molecular markers. *Genetika*, 40: 31-38.
46. Turner N.C. 1979. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: *Mussell H, Staples CR, eds. Stress physiology in crop plants*. New York: John Wiley & Sons, 343–372.

47. Worland A., V. Korzun, M. Röder, Ganai M. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theor Appl Genet*, 96:1110-1120.
48. Zhang K., Tian J., Zhao L., Wang S. 2008. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL × environment interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat. *Journal of Genetics and Genomics*, 35:119–127

ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЙ ТРУД

Публикации в научни списания:

- Kartzeva T.**, Balacheva E., Atanassova B., Molle E. 2009. Effect of anthocyaninless mutant genes on the content of compounds related to nutritive quality in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Acta Horticultrae*, 830:285-289.
- Kartzeva T.**, Balacheva E., Atanassova B., Molle E. 2012. Effect of three anthocyaninless genes on germination ability of the *brown seed (bs)* mutant in tomato. *Seed Science and Technology*, 40:177-184. **IF (2012) 0.62**
- Karceva T.**, Landjeva S., Börner A. 2012. Effects of wheat *Rht-B1b*, *Rht-B1c* and *Rht-D1b* genes on plant height and yield potential under the climatic conditions of Bulgaria. *European Cereals Genetics Co-operative Newsletter*, 133-137.

Участия в научни форуми:

- Kartzeva T.**, Balacheva E., Atanassova B., Molle E. 2009. Study of the content of compounds related to nutritive quality in anthocyaninless tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. XVI Eucarpia meeting Working group Tomato, 12-15 May, 2008, Wageningen, Netherland. pp. 38.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Kocheva K.V., **Kartzeva T.**, Landjeva S., Georgiev G.I. . Physiological response of wheat seedlings to mild and severe osmotic stress. *Cereal Research Communications*. 2009, 37 (2): 199-208.

1. Geravandi M., Farshadfar E., Kahrizi D. 2011. Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1):69-75.
2. Bencze S., Bamberger Z., Janda T., Balla K., Bedő Z., Veisz O. 2011. Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities. *Central European Journal of Biology*, 6(3):376-387.
3. Jiang J., Su M., Chen Y., Gao N., Jiao C., Sun Z., Li F, Wang C. 2013. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment. *Biologia*, 68(2):231-240.
4. Farshadfar E., Elyasi P., Hasheminasab H. 2013. Incorporation of agronomic and physiological indicators of drought tolerance in a single integrated selection index for screening drought tolerant landraces of bread wheat genotypes. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4:3314-3325.

Landjeva S., **Karceva T.**, Korzun V., Ganeva G. 2012. Seedling growth under osmotic stress and agronomic traits in Bulgarian semi-dwarf wheat: comparison of genotypes with *Rht8* and/or *Rht-B1* genes. *Crop and Pasture Science*, 62(12):1017-1025.

5. Чеботар Г.О. 2012. Алелі генів короткостебловості *Rht8*, *Rht-B1*, *Rht-D1*, нечутливості до фотоперіоду *Ppd-D1* м'якої пшениці та їх ефекти на агрономічні ознаки//Дисертація на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук. Одеса, 185 с

6. Divashuk M. G., Beshpalova L. A., Vasilyev A. V., Fesenko I. A., Yu O., Puzyrnaya N., Karlov G. I. 2013. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia. *Euphytica*, 190(1):137-144.
7. Mohan A., Schillinger W.F., Gill K.S. 2013. Wheat seedling emergence from deep planting depths and its relationship with coleoptile length. *PLoS ONE* 8(9), e73314. doi:10.1371/journal.pone.0073314.
- Landjeva S., Kocheva K., **Karceva T.**, Sepsi A., Molnár I., Schneider A., Ganeva G., Georgiev G., Molnár-Láng M. 2012. Molecular cytogenetic identification of a wheat-*Aegilops geniculata* Roth spontaneous chromosome substitution and its effects on the growth and physiological responses of seedlings to osmotic stress. *Plant Breeding*, 131:81-87.
8. Zhao H., Zhang W., Wang J., Li F.R., Ji J., Li J.M. 2013. Research progress on improving wheat drought tolerance via exotic gene introduction. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 21:267-273.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на научните си ръководители проф. дн Бистра Атанасова и доц. д-р Светлана Ланджева за помощта в научната дейност и всеотдайната подкрепа. За съдействието и напътствията при провеждането на някои от експериментите изказвам благодарност на колегите от секции “Приложна генетика и биотехнология на растенията” (ИФРГ) и “Минерално хранене” (ИФРГ).

Признателна съм на семейството си за любовта, грижите и подкрепата.



Благодаря за финансовата подкрепа по проектите:

- 1. Проект № Б-1538/05, финансиран от МОН на тема „Проучване на ефекта на гените за ниско стъбло (*Rht*) върху адаптивния отговор на пшеницата към засушаване”. Ръководител: доц. д-р Светлана Ланджева**
- 2. Проект № БИн-6/07 г. за двустранно научно сътрудничество между Република България и Република Индия на тема: ”Създаване на генотипове домати, притежаващи ценни икономически качества”. Ръководител: проф. дн Бистра Атанасова**
- 3. BG051PO001-3.3.06-0025 Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентоспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми; Ръководител: доц. д-р Леонид Петков**