

## ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ" ФАКУЛТЕТ "БИОЛОГИЯ"

Катедра "Физиология на растенията и Молекулярна биология"

# Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. Orobanchaceae (Воловодецови)

# АВТОРЕФЕРАТ на ДИСЕРТАЦИЯ

## за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"

## НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:

4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3 Биологически науки, Научна специалност: Молекулярна биология

> Научен ръководител: Проф. д-р Илия Денев

Докторант: Ина Димитрова Кирилова

> ПЛОВДИВ 2019

#### Данни за дисертационния труд:

Дисертацията съдържа 116 страници, 5 таблици и 27 фигури. Цитирани са 219 литературни източника, от които 207 на английски, 7 на руски и 5 на български.

Докторантката има публикувани общо 7 статии и три участия в международно конгреси. 5 от публикациите са в списания с импакт фактор.

Дисертацията е базирана на две от тези статии, които са в списания с импакт фактор.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.10.2019 в семинарната зала на кат. "Физиология на растенията и молекулярна биология"

Материалите по защитата са на разположение за интересуващите се в центъра по кариерно развитие към ПУ "П, Хилендарски" – ректорат, ул. "Цар Асен" №24 ет. 1, стая 120

#### ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ"ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ" ФАКУЛТЕТ "БИОЛОГИЯ"

Катедра "Физиология на растенията и Молекулярна биология"

#### Ина Димитрова Кирилова

Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. Orobanchaceae (Воловодецови)

### А В Т О Р Е Ф Е Р А Т на

#### ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:

4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3 Биологически науки, Научна специалност: Молекулярна биология

> Научен ръководител: Доц. д-р Илия Денев

Научно жури: Доц. д-р Мариана Гозманова – председател Проф. дсн. Росица Бъчварова – рецензент Проф. д-р Иван Атанасов - рецензент Проф. д-р Нася Томлекова Проф. д-р Илия Денев

> ПЛОВДИВ 2019

#### ДЕКЛАРАЦИЯ

#### От Ина Димитрова Кирилова

редовен докторант към катедра, Физиология на растенията и Молекулярна биология"

на Биологически факултет към ПУ "Паисий Хилендарски"

Във връзка с провеждането на процедура за придобиване на образователната и научна степен "доктор" в Пловдивския университет "Паисий Хилендарски" и защита на представения от мен дисертационен труд, декларирам:

Резултатите и приносите на проведеното дисертационно изследване, представени в дисертационния ми труд на тема: " Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. Orobanchaceae (Воловодецови)" са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които нямам участия.

#### ДЕКЛАРАТОР:

#### Ина Димитрова Кирилова а

гр. Пловдив

#### Използвани съкращения

DMBQ - 2,6 - диметокси -р -бензохинон

ETS - външен транскрибиращ спейсър

IGS - интергенен спейсър

ITS - вътрешен транскрибиращ спейсър

NCBI- национален център за биоинформатична информация

PCR - полимеразна верижна реакция

РМЕ - пектин метил естераза

qRT-PCR – количествен real-time PCR

ТАЕ – трисацетатен буферен разтвор

ТВЕ – трисборатен буферен разтвор

UTM-квадранти

СП - стимуланти на прорастването

ХИФ - хаустория-индицуращ фактор

#### въведение

Феноменът паразитизъм (развитие на един организъм за сметка на друг) при висшите растения все още не е добре изучен. Освен фундаментално-научно значение той има и голямо практическо значение, тъй като представители на паразитните растения причиняват огромни щети на реколтата от важни селскостопански видове. Ето защо е необходимо създаването на устойчиви към тези паразити форми.

Паразитните растения от родовете Striga и Orobanche причиняват ежегодно огромни щети на селското стопанство в световен мащаб и особено в страни от Средиземноморието, Югоизточна Европа, Средния Изток и Северна Африка. В нашата страна, която по своето географско положение и климатични особености предоставя всички необходими условия за развитието на паразити от рода Orobanche, няколко вида синя китка паразитират по ценни културни видове растения и причиняват сериозни икономически загуби (Tchalakov et al., 1991, Wegmann, 1998; Slavov et al., 2001, Samejima and Sugimoto, 2018). Борбата със синята китка е изключително трудна, което се дължи на специфичната и физиология (Musselman, 1980, Musselman, 1994, Joel, 2000, Gevezova et al., 2012). Във връзка с това през последните години се провеждат интензивни изследвания насочени към изясняване механизмите на взаимодействие в системата паразит-гостоприемник, разработване на ефикасни методи за борба със синята китка, в това число и създаване на устойчиви сортове от селскостопанските култури към този паразит (Gevezova et al., 2012).

Понастоящем основен източник за създаване на устойчиви форми е естествения генофонд от културни растения и техните диви родственици. Този фонд може да се разшири чрез индуциране на мутации с физически и химически мутагени и генетична трансформация.

Генетичното манипулиране с цел активиране на различни гени свързани с механизмите на устойчивост и молекулярното селекциониране са най-добрата алтернатива за контрол на синята китка, но наличните в момента познания за гените осигуряващи устойчивост са съвсем недостатъчни (Joel, 2000, Westwood et al., 2001; 2012, Clermont et al., 2019).

#### ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

Литературния преглед е базиран на 220 литературни източника, като последователно разглеждаме следните раздели: 1. Ботаническо разнообразие и гостоприемници на синята китка; 2. Разпространение на стопанско значимите видове синя китка 3. Систематика и таксономия на сем. *Orobanchaceae* 4. Представи за произхода и еволюция на паразитните представители на сем. *Orobanchaceae*; 5.Жизнен цикъл на сем. *Orobanchaceae*; 6. Arabidopsis thaliana, като моделна система за изследване на Orobanchaceae 7. Механизъм на агробактериалната трансформация. 8.Устройство на pSKI015.

#### ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:Да се направи молекулярно-генетичен анализ на мутантни генотипове Arabidopsis thaliana, съдържащи pSKI015 Т-ДНК инсърти ,проявяващи устойчивост към паразитни растения от групата на синята китка (Phelipanche ramosa/ и P. mutelii)

#### Задачи:

1. Скриниране на 62 000 активационни мутанти за откриване на линии, устойчиви срещу опаразитяване.

2. Анализ по методът на Magnus et al., 1992, модифициран от Denev et al., 2007 на устойчивите индивидуални линии Arabidopsis за промяна в нивата на продукцията на стимуланти на прорастване.

3. Изолиране на хромозомна ДНК и на иРНК от устойчивите на опаразитяване линии.

4. Определяне на броят на Т-ДНК инсъртите в утойчивите срещу опаразитяване мутантни линии, чрез Southern blot

5. Провеждане на TAIL – PCR, RT-PCR, qRT-PCR и Differential display анализи за идентифициране на повлияните гени.

#### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

В изследванията представени в настоящия дисертационен труд са използвани 62 000 линии активационни мутанти на *Arabidopsis thaliana* L. и 7 проби семена на *Phelipanche ramosa* събрани от 7 локалитета в България.

#### 2.МЕТОДИ

#### 2.1.Изолиране на ДНК

За изолиране на ДНК от семена на *Phelipanche ramosa* използвахме innuPREP DNA Mini Kit на Analytik Jena AG, като беше следван протокола препоръчан от фирмата.

**2.2. За изолиране на ДНК** от *Arabidopsis thaliana* използвахме DNAesy Plant Mini кит на Qiagene

**2.3.Количеството изолираната ДНК** се определя спектрофотометрично чрез измерване на абсорбцията на проба при 260 nm при подходящо разреждане.

#### 2.4. Тестове за жизненост

Тестът се провежда по метода на Mauromicale et al. (2005), използвайки ТТС (2,3,5трифенилтетразол хлорид).

#### 2.5. Тестове за покълване

Тестовете за кълняемост са проведени по метода Mangnus et al (1992).

**2.6. За изолиране на ITS1/2 региона** от семена на *Phelipanche ramosa* са използвани анотираните в NCBI секвенции EU581802.1, EU581794.1, KM925015.1, AY209315.1, DQ003027.1, EU581801.1. Праймерите са синтезирани по зададените секвенции от фирматаMetabion AG.

#### 2.6.1. Биоинформатичен анализи и дизайн на праймери

Използвани са нуклеотидните секвенции на региона кодиращ 18S – ITS1-5,6S – ITS2-26Sрибозомна РНК при изследваните видове, анотирани в NCBI. Първоначалное направен алаймънт (алгоритъма Clustal W) на секвенциите посредством VectorNTI 10.1 за да се анализира вариабилността в анотираните секвенции. Получената консенсусна секвенция е изпозлвана за изготвяне на дегенеративни праймери посредством on-line програмата PRIMER 3 Plus. Праймерите бяха поръчани и доставени от германската фирма Metabion. **2.6.2. РСК реакциите за изолиране на ITS1/2 региона** са провеждани в реакционна смес съдържаща 2 µl матрична ДНК с концентрация  $\approx 100$  µl, 1 µl прав и обратен праймер – 10 pmol/ µl (n=6-9); 9.5 µl стерилна дестилирана вода; 12.5 µl Master Mix (Fermantas). Програмата на РСК реакциите беше:94° С- 3 min; последвана от 35 цикъла 94° С- 45s; 55°С- 1.5 min; 72° С – 2.5 min и съхранение при 16° С -∞.

**2.6.3. РСК продуктите са разделени на 1,5% агарозен ге**лв 1Х ТАЕ буфер съдържащ 0,5 µl етидиев бромид. За да се проследи придвижването на РСК продуктите в агарозен гел, цялата реакционна смес от 25 µl се смесва с 3 µl Loading dye. Използва се и ДНК маркер 1kb-6 µl. Получените продукти са визуализирани посредством UV светлина.

**2.6.4 За екстракция на РСК фрагменти от гела,** беше използван кит от фирмата на Qiagene, като беше следван протокола препоръчан от фирмата.

#### 2.7.4.Секвениране

Пробите са секвенирани в GATC центъра по Биоинформатика – Германия.

#### 2.8. Изготвяне на ДНК проба за Southern хибридизация

Пробите са белязани чрез PCR реакции, в които част от dTTP са заменени с Dig-11dUTP (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche). За изготвяне на пробите са използвани специфични праймери комплементарни на фрагмент от лявата граница на Т-ДНК инсърта които при следните условия на PCR амплификация дават фрагмент с размер 810 нд.

Прехибридизирането и хибридизирането на мембраната, и белязването на ДНК пробата е извършено с продукти за нерадиоактивна хибридизация на фирма Roche, като са спазени инструкциите на производителя.

За проявяване на специфично хибридизираните проби се използва DIG Luminescent Detection Kit (Roche), съгласно приложените указания на фирмата производител.

**2.9 Зза изолиране на тотална РНК** използвахме 50 милиграмови проби от всяка изследвана линия, които обработвахме с кит на RNeasy plant mini кит на Qiagen.

#### 2.10. Количествен RT-PCR.

Ние използвахме РНК изолирана от див-тип и от устойчивите линиии Arabidosis преди и в процеса на взаимодействие с паразита за да проследим посредством количествен RT-PCR нивата на експресия на откритите при TAIL-PCR кандидат гени. Бяха разработени праймери фланкиращи продукт с приблизителен размер 150 – 200 н.д. Белязването беше проведено със Syber green.

#### 2.11. Differential display

Следваме протокола описан от Liang and Pardee (1992) с известни модификации направени в лабораторията на Dr. Westwood с цел адаптация към растителни обекти.

#### 2.12.Анализ на данните

Получените данни от секвенирането бяха подложени на биоинформатичен анализ по алгоритмите Maximuml ikelihood и прилагане на молекулен часовник посредством софтуер MEGA 7.

#### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

# 1. Събиране на семена от синя китка и анализ на жизнеността и къняемостта на семената от синя китка

Семената бяха събрани от различни региони на страната които са представени в таблица 1

Таблица 1

Списък на събраните проби от семена с местоположението и видовата принадлежност определена по морфологичните им характеристики

N₂	Имена на видовете	Местоположение	Кратко име на пробата
	по морфология на		
	семената.		
1	P. mutelii	Тютюнева нива край Марково 1	P. mutelii Markovo 1
2	P. mutelii	Тютюнева нива край Марково 2	P. mutelii Markovo 2
3	P. mutelii	Тютюнева нива край Козарско 1	P. mutelii Kozarsko 1
4	P. muteliil	Тютюнева нива край Козарско 2	P. mutelii Kozarsko 2
5	P. mutelii	Тютюнева нива край Ягодово 1	P. mutelii Yagodovo 1
6	P. mutelii	Тютюнева нива край Ягодово 2	P. mutelii Yagodovo 2
7	P. mutelii	Доматена нива край Кърджали	P. mutelii Kardzhali
8	P. muteliil	Тютюнева нива край Тополовград 1	P. mutelii Topolovgrad 1
9	P. mutelii	Тютюнева нива край Тополовград 2	P. mutelii Topolovgrad 2
10	P. mutelii	Доматена нова край Хасково 1	P. mutelii Haskovo 1
11	P. mutelii	Тютюнева нива край Хасково 2	P. mutelii Haskovo 2
12	P. muteliil	Тютюнева нива край Хасково 3	P. mutelii Haskovo 3
13	P. mutelii	Тютюнева нива край Харманли 1	P. mutelii Harmanli 1
14	P. mutelii	Тютюнева нива край Харманли 2	P. mutelii Harmanli 2
15	P. mutelii	Тютюнева нива край Разлог 1	P. mutelii Razlog 1
16	P. muteliil	Тютюнева нива край Разлог 2	P. mutelii Razlog 2
17	P. mutelii	Тютюнева нива край Разлог 3	P. mutelii Razlog 3
18	P. mutelii	Тютюнева нива край Благоевград 1	P. mutelii Blagoevgrad 1
19	P. mutelii	Тютюнева нива край Благоевград 2	P. mutelii Blagoevgrad 2
20	P. muteliil	Тютюнева нива край Благоевград 3	P. mutelii Blagoevgrad 3
21	P. mutelii	Доматена нова край Прослав 1	P. mutelii Proslav 1
22	P. mutelii	Тютюнева нива край Прослав 2	P. mutelii Proslav 2
23	P. mutelii	Тютюнева нива край Дуванлии 1	P. mutelii Duvanlii 1
24	P. muteliil	Тютюнева нива край Дуванлии 2	P. mutelii Duvanlii 2
25	P. mutelii	Тютюнева нива край Варвара 1	P. mutelii Varvara 1
26	P. mutelii	Тютюнева нива край Варвара 2	P. mutelii Varvara 2
27	P. ramosa	Тютюнева нива край Марково 1	P. ramosa Markovo 1
28	P. ramosa	Тютюнева нива край Марково 2	P. ramosa Markovo 2
29	P. ramosa	Тютюнева нива край Козарско 1	P. ramosa Kozarsko 1
30	P. ramosa	Тютюнева нива край Козарско 2	P. ramosa Kozarsko 2
31	P. ramosa	Тютюнева нива край Разлог	P. ramosa Razlog
32	P. ramosa	Тютюнева нива край Гоце Делчев 1	P. ramosa GotseDelchev
		_	1
33	P. ramosa	Тютюнева нива край Гоце Делчев 2	P. ramosa GotseDelchev
			1
34	P. ramosa	Тютюнева нива край Прослав	P. ramosa Proslav

Жизнеността беше определяна по начина описан в раздел материали и методи. Тъй като бяха събрани семена от два различни вида: Р. mutelii и Р. ramosa, за Р. ramosa тя беше 87% ± 3.5%

Кълняемостта беше тествана и за двата вида посредством третиране с GR24. Резултатите са представени на фиг. 2 и кореспондират със жизнеността.



Фиг. 2. Относителен процент на поникване на семената на *P. ramosa* и *P. mutelii* след третиране с GR24.

#### 2. Молекулярно генетично определяне на видовата принадлежност на семената

За да можем да определим по молекулярни маркери видовата принадлежност на събраните семена изолирахме ДНК от събраните проби.

Алайнмента на секвенциите е направен посредством програмата Vector NTI 11, както това е описано в M&M. Получената в резултат на алаймента консенсусна секвенция (фиг. 2) беше прехвърлена в on-line програмата PRIMER 3 Plus за изготвяне на праймери. Бяха избрани нуклеотидни последователности с дължина между 20-22 бази. Праймерите бяха така подбрани, че да може да бъде изолирана цялата секвенция между 18S и 26 S за всеки един прав праймер, комплименттарен на областта в близост до 3' края на 18S pPHK, а обратните праймери - на областа в близост до 5' края на 26S секвенцията. Праймерите са представени в таблица 2.

Таблица 2

Phelipanche ramosa/mutelii				
Име на праймера	Секвенция 5'-3'	Tm		
18S Fw1	5'- CTGTTTGATGAGCRTGCGTA-3'	56.6		
18S Fw2	5'- GGTCAGVTAAAGGCTGACCA-3'	56.8		
26 S Rev1	5'-TTTCTCCTTAGGCGCATMTCTC -3'	55,5		
26 S Rev2	5'-GATTCAATCCAGCCACAGGT-3'	56.3		

0         0				20	30 4			60	70	80	90	100
Obstants starts that for the starts that fo		(1)	1 10	20		10	20	00				
October:         Sector:         <	Orobanche arenaria from Germany	(1)	ICGAAACCIGCAAAAGO	CAGACCGTGAAC	TGTTCAACCA1	AATGGATTC.	ATGGTGGG	CGGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Oppose were service of the s	Orobanche arenaria isolate 1 from Italy	(1)	icgaaaccigc <mark>a</mark> aaago	CAGAC <mark>C</mark> GTGAAC	ATGTTCAACCAT	PAATGGATTC.	ATGGTGTG	C <mark>GGGG-</mark> CAN	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	CTCCCTCACAT	GCCCACTTA
Cacher to ensure that 3 for 1, 40         Image: 1 mining of the second sec	Orobanche arenaria isolate 2 from Italy	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>C</mark> GT <mark>GA</mark> ACJ	ITGTTCAACCA1	AATGGATTC.	ATGGTGTG	C <mark>GGGG-</mark> CAA	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCAC	TCCCTCACAI	GCCCACTTA
Octavale approx for Gree is the structure 1.         ()         (	Orobanche arenaria isolate 3 from Italy	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAGC	CAGAC <mark>C</mark> GTGAACJ	ATGTT <mark>CAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	'ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG</mark> - <mark>CAA</mark>	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	'ATGTT <mark>CCAC</mark>	CTCCCTCACAI	GCCCACTTA
Control for priority or upriority or upriority of the second of the s	Orobanche purpurea from Greece internal transcribed s	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAGC	CAGAC <mark>C</mark> GTGAACJ	ATGTT <mark>A</mark> AACCAT	PAATGGATTC.	'ATGGTG <mark>G</mark> G	T <mark>GGGG-</mark> CAA	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	'ATGTT <mark>CCAC</mark>	CTCCCTCACAI	GCCCACTTA
Control         Control <t< td=""><td>Orobanche purpurea var. purpurea from Austria</td><td>(1)</td><td>ICGAAACCIGC<mark>A</mark>AAAGC</td><td>CAGAC<mark>C</mark>GTGAACJ</td><td>ATGTT<mark>A</mark>AACCAT</td><td>PAATGGATTC.</td><td>'ATGGTG<mark>G</mark>G</td><td>G<mark>GGGG</mark>G<mark>CAA</mark>I</td><td>CCCC<mark>CAC</mark>ATC.</td><td>'ATGTT<mark>CCAC</mark></td><td>CTCCCTCACAI</td><td>GCCCACTTA</td></t<>	Orobanche purpurea var. purpurea from Austria	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAGC	CAGAC <mark>C</mark> GTGAACJ	ATGTT <mark>A</mark> AACCAT	PAATGGATTC.	'ATGGTG <mark>G</mark> G	G <mark>GGGG</mark> G <mark>CAA</mark> I	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	'ATGTT <mark>CCAC</mark>	CTCCCTCACAI	GCCCACTTA
Ordencies propers w. purporte for decisis attention         0         0.00000000000000000000000000000000000	Orobanche purpurea var. purpurea from Georgia	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACF	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	'ATGGTG <mark>G</mark> G	G <mark>GGGG</mark> G <mark>CAA</mark>	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	TCCCTCACAI	GCCCACTTAC
Physical Deprints outche Media       1       <	Orobanche purpurea var. purpurea from Georgia interna	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAGC	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	G <mark>GGGG</mark> G <mark>CAA</mark> I	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	CTCCCTCACAI	GCCCACTTAG
Objected purpues are. Nothing Notify (1)       Status and Status are status in the Notify (1)       Status are status are status in the Notify (1)       Status are st	Phelipanche purpurea voucher herb. Sanchez-Pedraja 1	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACF	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	'ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-</mark> CAA	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	TCCCTCACAI	GCCCACTTAG
Oblanch purpure un oblanch ability 1       1000000000000000000000000000000000000	Orobanche purpurea var. bohemica from Italy	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-CAA</mark>	CCCCCCTATC.	ATGTTCCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Orderiche sende lace Am Genere       0       <	Orobanche purpurea var. bohemica isolate 1	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-CAA</mark>	CCCCCCTATC.	ATGTTCCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Obtache March Mart Mart Mart Mart Mart Mart Mart Mart	Orobanche lavandulacea from Greece	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GAACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-CAA</mark>	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Loseneta nuclei minutaria in unclei minutaria in alla serie in alla seri	Orobanche lavandulacea isolate 1 from Italy	(1)	ICGAAACCIGC <mark>A</mark> AAAGC	CAGAC <mark>CGT</mark> G <mark>A</mark> ACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-</mark> CAA	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	CTCCCTCACAI	GCCCACTTAG
Operation of the section of	Orobanche mutelii from Australia	(1)	ICGAAACCTGCTAAAG0	CAGAC <mark>CGT</mark> GCAC <i>I</i>	ATGTT AAACCAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	C <mark>GGGG-CAA</mark>	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	'ATGTTCCAC	TCCCTCACAI	GCCCACTTAG
network in a synchronic family famil	Orobanche muteli isolate 1 from Spain	(1)	ICGAAACCIGC <mark>I</mark> AAAGC	CAGAC <mark>CGT</mark> GCACJ	ATGTT <mark>AAA</mark> CCAT	PAATGGATTC.	ATGGTG <mark>G</mark> G	C <mark>GGGG-</mark> CAA	CCCC <mark>CAC</mark> ATC.	ATGTTCCAC	CTCCCTCACAI	GCCCACTTAG
Contact or marked to marked to the fact of	Phelipanche cr. aegyptiaca GMS-2008 Internal transcribe	(1)	PCGAAACUTGCAAAAGC	CAGACCGIGAAC	TGTTAAACCAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	CGGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTCCAU	PTCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Decamely source rest, service	Orobanche cr. rosmanna HST 7615 from Span	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	CAGACTG	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	GGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTICAC	PICCUTCACAI	GCCCACTTAG
Undance frage frag	Orobanche rosmanna voucher herb. Sanchez Pedraja 12	(1)	rcgaaacurgcaaaag	CAGACTGIGAAC	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	IGGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTICAC	FICCUTCACAI	GCCCACTTAG
Observed of supprises HF 64.1 state 1 mm Gev         1         Subserved su	Urobanche rosmanna voucher herb. Sanchez Pedraja 12	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	CAGACTG	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	GGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTICAC	PICCUTCACAI	GCCCACTTAG
December and provide from 1.6 km in the 1.6	Phelipanche rosmarina internal transcribed spacer 1	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	CAGACTGTGAAC	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	GGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTICAC	PICCUTCACAI	GCCCACTTAG
Helperich frende vorder freite, i.s. is informational and intervent of a standard and inter	orobanche ch. aegyptiaca HST 8611 Isolate 1 Hom Geor	(1)	ICGARACUTGURARAGO	AGACCGIGAAC	TGTTAAATAAT	TANTGGATTC.	ATGGTGGG	IGGGG-CAR	CCCCCACATC.	AIGIILAC	TUUUTUAUAI	GUUCAUTTAG
Operation of a minute in the constraint of	Pheipanche ramosa voucher hero. G F. B. Navarro 18.8	(1)	PCGAAACUTGCAAAAGC	CAGACCGTGAAC	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	IGGGG-CAA	CCCCCACATC.	ATGTTCAU	PTCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Opbote:         000000000000000000000000000000000000	Orobanche cr. oxyloba Albach 661 from Turkey	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	CAGACUGCGAAC	TGTTAAATAAT	PAATGGATTC.	ATGGTGGG	GGGG-CAA	CCCC-ACATC	ATGTTICAC	PICCUTCACAI	GCCCACTTAG
Under the state and the function of the state and	Orobalicite oxylobalitoni Greece	(1)	ICGARACUTGURARAGO	-AGACCGCGAACI	TGTTAAATAAT	TANTGGATTC.	ATGGTGGG	IGGGG-CAR	CCCC-ACATC.	AIGIILAC	TUUUTUAUAI	GUUCAUTTAG
Decomposed of an analysis of a second of a seco	Orobanche oxyloba isolate 1 from Lurkey	(1)	TOGRAACCIGCAAAAGC	CACACCGCGAACA	TGTTAAATAA1	AATGGATTC.	MTGGTGGG	CCCC-CAA	CCCC-ACATC	ATGTTICAC	FOCCTUACAI	GOCCAUTTAG
Implementation       Imple	Pholosoche of page GMS-2009 voucher hert Constant	(1)	TOGRARUCTGURAAAGO	CACACOCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	TOTTARATAA1	AATGGATTU	ATGGTGGG	CCCC-CAA	CCCC-ACATC	ATOTTICAC	TOCOTOACAT	GCCCACTTAG
Observed-reserved reserved reserve	Principanone or. Halla GMS-2006 VOUCHER HefD, Sanchez	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	AGACCOCCAACA	TOTTANATAAT	AATGGATTC.	ATGGTO	GGGC-CAN	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TOCOTOACAT	GCCCACTTAG
Perspective and a second of the second of th	Orobancha papa indate 1 fmm Crosses	(1)	TOCANACCTOCAMAGO	a cace of control	TOTTA A ATAA	a a mocarro	AMOONO	CCCC CTA	coco-nentu	ATOTTCAL	CICCUTCACA1	CCCCACTTAG
1000       10000       1000	Phelinanche nana voucher herb. G 16508 intermal teners	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	AGACCOCCAAC	TOTTANATAAT	AATGGATTC.	ATGGTGGG	CAAU-CAAU	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TOCOTOACAT	GCCCACTTAG
Organzia di 1999 suble 2 inni Gessi (1)         Scalazzer da Auccianti di 2 e azren di Aussi anticonte e acces di Aussi anticonte e accesso di Aussi anticonte accesso di aussi anticonte e accesso di Aussi anticonte accesso d	Ornhanche cf. nana Gu 34174 isolate 1 from Greece	(1)	TCGAAACCTGCAAAGC	CAGACCOCCARC	TGTTAAATAA	PAATGGATTC	ATGGTGGC	CGGG-CAN	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
1000       10000       1000	Orobanche cf. nana Gu 34999 isolate 2 from Grocco	(1)	TCGAAACCTGC	AGACCOCCA AC	TOTTALATA	AATGGATTO	ATGGTO	COCC-CAN		ATCTTCA	TOCOTOLON	GCCCLCTTR
Concernmentation of 1         0         Concernmentation of 1         0         Concernmentation of 1	Ornhanche ramos from Coornia	(1)	TCGAAACCTGCAAAAG	CAGACCOCCARCO	TOTTALATA	TAATGGATTC.	ATGGTG		CCCC- ACATC	ATGTTCAC	TOCOTOACAT	GCCCACTTAG
Phelpanche annos         10         Testadance de adactade de la carter de la car	Orobanche ramosa isolate An1 4	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC		TOTTADATAAT	PARGGATTC	ATCOTOC	TGGGG-CAN	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Produce anose interest and and another and a second of	Phelinanche ramosa 1	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC	CAGACCOCCAACI	TOTTADATAAT	PARCGATTC	ATCOTOC	TGGGG-CAN	CCCC-ACATC	ATCTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Pelpanche rannos internal transcheding zur 1	Theipunche futious a	(1)	TCGAAACCTGCAAAAGC		TOTTADATAAT	PARGGATTC	ATCOTOC	TGGGG-CAN	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Converse	Phelinanche ramosa 2	(4)	- contract ochinatio		TOTTA NATA NO		ATCOTOC	TGGGG-CAN	CCCC-ACATC	ATGTTCAC	TCCCTCACAT	GCCCACTTAG
Handle Hernikelsen Berlanden       Status	Phelipanche ramosa internal transcribed spacer 1	(1)	7002222007002222200									CCCCACTTA
Obtache servis kolz         Ten Balgóon         Celeborative anna kolz         <	Phelipanche ramosa Phelipanche ramosa internal transcribed space 1 Consensus	(1) (1)	TCGARACCTGORRAAGG TCGARACCTGORRAAGG	CAGACCOTGAACI	ATGTTAAATAAT	PAATGGATTC	ATGOTOGO		CCCCCACATC	ATGTTCAC	CTCCCTCACAT	
Ubbacke erwais solet 2 mm Bay(00)         CLANCTAGE ALL TATORNEY CONTRACTOR ALL TATOR CONTRACTOR ALL TATOR ALL TATORNEY CONTRACTOR ALL TATOR A	Phelpanche ramosa internal transched space 1 Phelpanche ramosa internal transched space 1 Conservers	502	TCGAAACCTGCAAAAGC TCGAAACCTGCAAAAGC 510 520	DAGACCOTGAAC2	раларын 540	FAATGGATTC 550	560	9- 570	сссссасатс 580	ATGTTTCAC	600	611
Ubbache envais kobé z from žaš(00)         CALCACTAR         ZALCACTAR	Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consensus Orobanche asenaria finm Germany(50) Orobanche asenaria finm Germany(50)	502	TOGAAACCTGCAAAAGC TOGAAACCTGCAAAAGC 510 520 CCTCACCGACTACTGCTG	530	540	550	S60	9- 570	S80	SPO AAT COTGCG	600 ACTOCCTORORO	61)
Orbitache enneis kohe 3 fram Bark(190)         Extention A Extended A 1400 Filter (1900)         Extention A 1500 Filter (1900)	Phelpanche ramosa 2 Phelpanche ramosa internal transcitetei spacer 1 Conversion Orobanche arenaria from Germany(S01) Orobanche arenaria kobiet 1 from 184/(S01)	502 502 ACTCA	TEGAAACCTECAAAAG TEGAAACCTECAAAAG 510 520 KEGTCACGACTAGTGGTG CEGTCACGACTAGTGGTG	530 STIGATCACAAC	540 FCCCGTCCT GTC	550 TTGCTGATT	560 570 570 570 570 570 570 570 570 570 57	9- 570 570 190 190 190 190 190 190 190 190 190 19	580 TAATAGACCC TAATAGACCC	590 AAT <mark>GGTGCGA</mark>	600 ACTOTOGTGCC	61) TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
banck pupues v.         pupues (e.g. p	Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consensus (502) Orobanche arenaria kabite 1 from IAy(500) Orobanche arenaria kabite 1 from IAy(500)	502 ACTCA	EGRAACCEGAAAGE TEGRAACETEGRAAAGE 510 520 ACETCACEACTAGTGGTG ACETCACEACTAGTGGTG	530 STTGATCACAACT STTGATCACAACT STTGATCACAACT	540 CCCCGTCCT STC CCCCGTCCT STC CCCCGTCCT STC	550 TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT	560 57CTCGCT 57CTCGCT 57CTCGCT	570 570 Cotage to Cotage to Cotage to	580 TARTAGACCO TARTAGACCO TARTAGACCO	590 AATGETGCG AATGETGCG AATGETGCG	600 ACTOTOGTGCC ACTOTOGTGCC ACTOTOGTGCC	611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
Obsache pupues ver, pupues fom Austrikes         Exclamation al 20050000000000000000000000000000000000	Phelpanche ramosa internal transcitet spacer Phelpanche ramosa internal transcitet spacer Convensis Orobanche arenaris fom Germany(S0I) Orobanche arenaris isolate 1 from Iakj(S00) Orobanche arenaris isolate 2 from Iakj(S00) Orobanche arenaris isolate 2 from Iakj(S00)	502 ACTCA ACTCA ACTCA	510 520 CGTARACCTGCARAAGO 510 520 CGTCACCACTAGTGGTG CGTCACCACTAGTGGTG CGTCACCACTAGTGGTG CGTCACCACTAGTGGTG	530 STTGATCACAAC STTGATCACAAC STTGATCACAAC STTGATCACAAC	540 540 recesse effec recesse effec recesse effec recesse effec	550 TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT	560 GTCTCGCT: GTCTCGCT: GTCTCGCT: GTCTCGCT:	570 570 Corgeorc Corgeorc Corgeorc Corgeorc	580 580 TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO	590 AATGCTGCGJ AATGCTGCGJ AATGCTGCGJ AATGCTGCGJ	600 ACTOCOGTOCO ACTOCOGTOCO ACTOCOGTOCO ACTOCOGTOCO ACTOCOGTOCO	611 TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG
Orbanche nupures aux. pupures fins Messel (198)         Inclusion (1980)         Inclusion (1980) <thinclusion (1980)<="" th="">         Inclusion (1980)</thinclusion>	Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consensus Orobanche arenaris isobite 1 from Bay(500) Orobanche arenaris isobite 1 from Bay(500) Orobanche arenaris isobite 1 from Bay(500) Orobanche arenaris isobite 1 from Bay(500) banche purpure Bron Greece internal intersche 5(57)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	TORAACCTORAAACC TORAACCTORAAAAC 510 520 COTORACACTACTGOTG COTORACACTACTGOTG COTORACACTACTGOTG COTORACACTACTGOTG COTORACACTACTGOTG	530 STIGATOR CAACI STIGATOR CAACI STIGATOR CAACI STIGATOR CAACI STIGATOR CAACI	540 FCCCGTC CTGTC FCCCGTC CTGTC FCCCGTC CTGTC FCCCGTC CTGTC FCCCGTC CGTC FCCCGTC CGTC	550 TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT	560 570 570 570 570 570 570 570 570 570 57	570 570 CCTGGGCTC CCTGGGCTC CCTGGGCTC CCTGGGCTC	580 TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO	590 590 AAT COTOCO AAT COTOCO AAT COTOCO AAT COTOCO AAT COTOCO AAT TTTCCO	600 ACTCCGTGCC ACTCCGTGCC ACTCCGTGCC ACTCCCGTGCC ACTCCCGTGCC	61) TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
backe pupues av. pupues av. pupues find Gorgia itema	Phelpanche ramosa internal transcited spacer i Crowness (2002) Orobanche arenaria from Germany(500) Orobanche arenaria isolate 1 from 1ak/(500) Orobanche arenaria isolate 2 from 1ak/(500)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510 520 510 520 510 520 COTCACGADTAGTOGTG COTCACGADTAGTOGTG COTCACGADTAGTOGTG COTCACGADTAGTOGTG COTCACGADTAGTOGTG	530 GTIGATCACAAC GTIGATCACAAC GTIGATCACAAC GTIGATCACAAC GTIGATCACAAC GTIGAACCAAC	540 ECCOGTO CTOTO ECCOGTO CTOTO ECCOGTO CTOTO ECCOGTO CTOTO ECCOGTO COGTO ECCOGTO COGTO	550 TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT TTCCTGAATT	560 570TCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTTGCT GTCTTGCT	570 570 CCTGGGCTC CCTGGGCTC CCTGGGTC CCTGGGTTC	580 TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO	590 590 AATGETGEG AATGETGEG AATGETGEG AATGETGEG AATGETGEG AATGETGEG	600 ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOGOCO ACTOCOGOCO	611 TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG
Banche purpures vucher henk. Sacher-Pedrag L	Phelpanche ramosa internal transcied space 1 Phelpanche ramosa internal transciede space 1 Consensus (502) Orobanche arenaria isolate 1 from Bak/S00) Orobanche arenaria isolate 2 from Bak/S00) Orobanche arenaria isolate 3 from Bak/S00) Dobanche purgues ave. purgues from Austrie(498) Orobanche purgues ave. purgues from Austrie(498)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510 52	530 530 IGTIGA TIA CAACI IGTIGA TIA CAACI IGTIGA TIA CAACI IGTIGA CAACI IGTIGA CCAACI IGTIGA CCAACI	540 recert of are recert of are	550 TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGTGAATT	560 GICTCGCT: GICTCGCT: GICTCGCT: GICTCGCT: GICTCGCT: GICTTGCT: GICTTGCT: GICTTGCT:	570 570 CCTGGGCTC CCTGGGCTC CCTGGGCTC CCTGGGTTC CCTGGGTTC CCTGGGTTC	580 TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO	590 AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG AATGCTGCG	600 ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC	610 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
Obsache purgues w. belenia fom Bal(99)         CCLADITALA LATABACHEL CALENCIAL CALEN	Phelpanche ramosa internal transcited spacer i Crowness (502) Orobanche arenaria from Germany(500) Orobanche arenaria isolate 1 from Iakj(500) Orobanche arenaria isolate 2 from Iakj(500) Orobanche purpurea var, purpure from Acergi(498) Bunche purpurea var, purpure from Acergi(498)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510         520           COTACCAST ACCOUNT         520           COTCACG ACTACTOGTO         COTCACG ACTACTOGTO	530 STTERTERTERTER STORTERTER STTERTER STTERTER STTERTER STTERRE STTERRE STTERRE CERRE STTERRE CERRE STTERRE CERRE		550 TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGCTGAATT TTGATGAATT TTGATGAATT TTGATGAATT	560 560 570 570 570 570 570 570 570 570 570 57	570 570 CCTGGG TC CCTGGG TC CCTGGG TC CCTGGG TC CCTGGGTTC CCTGGGTTC	580 TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO TAATAGACOO	590 AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG AAT COTGCCG	600 ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC	611 TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG TTCGATTGCG
Orbanche pupuras vs. bolemia isolate 1(47)         Chalanche value         Chalanche value <thchalanche th="" value<="">         Chalanche value<!--</th--><th>Phelpanche ramosa internal transcied space 1 Phelpanche ramosa internal transciede space 1 Consensus (502) Orobanche arenaria kolite 1 from Bak/500) Orobanche arenaria kolite 2 from Bak/500 Orobanche arenaria kolite 2 from Bak/500 Orobanche purgues ave. purgues from Acartis, 498 Orobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 banche purgures ave. purgues from Georgia (Hema, 498) sienche purgues volche hefts. Sachter-Berderia L. (Hell)</th><th>502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA</th><th>510 520 510 520 00000000000000000000000000000000000</th><th>530 S30 SGTGATCA CAACI SGTGATCA CAACI SGTGATCA CAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI</th><th>540 CCCGTL CI STC CCCGTL CI STC</th><th>550 TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGTGA TA TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT</th><th>560 GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTTCCT GTCTTCCT GTCTTCCT GTCTTCCT</th><th>570 570 Creector Creector Creector Creector Creector Creector Creector Creector</th><th>580 TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC</th><th>590 590 AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG</th><th>600 ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC</th><th>611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ</th></thchalanche>	Phelpanche ramosa internal transcied space 1 Phelpanche ramosa internal transciede space 1 Consensus (502) Orobanche arenaria kolite 1 from Bak/500) Orobanche arenaria kolite 2 from Bak/500 Orobanche arenaria kolite 2 from Bak/500 Orobanche purgues ave. purgues from Acartis, 498 Orobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 Dorobanche purgures ave. purgues from Acartis, 498 banche purgures ave. purgues from Georgia (Hema, 498) sienche purgues volche hefts. Sachter-Berderia L. (Hell)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510 520 510 520 00000000000000000000000000000000000	530 S30 SGTGATCA CAACI SGTGATCA CAACI SGTGATCA CAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI SGTGATC CCAACI	540 CCCGTL CI STC CCCGTL CI STC	550 TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGCIGA TT TIGTGA TA TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT	560 GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTTCCT GTCTTCCT GTCTTCCT GTCTTCCT	570 570 Creector Creector Creector Creector Creector Creector Creector Creector	580 TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC TAATAGACOC	590 590 AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG AATGSTGCG	600 ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC ACTOTOGIGOC	611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
Obsolute pupper to southables (1)         Instruction of second (2)	Phelpanche ramosa internal transcited spacer i Crossness (502) Orobanche arenaria from Germany(500) Orobanche arenaria tablet 2 from 184(500) Orobanche purpures ave, purpure from Accrig(498) banche purpures ave, purpure from Accrig(498) signanche purpures ave, purpure from Accrig(498) signanche numurea aver, bohenis from 184(450) Orobanche numurea aver, bohenis from 184(450)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510 520 510 520 00000000000000000000000000000000000	530 STICATOR CAAC STICATOR CAAC STICATOR CAAC STICATOR CAAC STICATOR CCAAC STICATOR CCAAC STICATOR CCAAC STICATOR CCAAC STICATOR CCAAC		550 TIGCTGA TT TIGCTGA TT	560 STCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT GTCTCGCT	570 570 570 570 570 570 570 570 570 570	580 TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO TAATAGACCO	590 590 AAT GETECG AAT GETECG	600 ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC ACTCTCGTGCC	611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
Unusual ensuranze num lescu(00)         Executive ensuranze num lescu(00) <th>Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consense (S12) Orobanche arenaria kolitet 1 from Bak/S00 Orobanche arenaria kolitet 1 from Bak/S00 Orobanche arenaria kolitet 2 from Bak/S00 Orobanche purgurea var. purgurea from Actrik(498) Orobanche purgurea var. purgurea from Actrik(498) Dorobanche purgurea var. purgurea from Georgia (Hema(498) iganche purgurea var. bohennica from Bak(497) Orobanche purgurea var. bohennica from Bak(497) Orobanche purgurea var. bohennica from Bak(497)</th> <th>502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA</th> <th>510 520 510 520 CONTRACTORONALISE 510 520 CONTRACT, SATURGORD CONTRACT, SATURGORD</th> <th>530 STIGATOR CAAC STIGATOR CAAC SETTOR TO RCAAC SETTOR TO RCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC</th> <th></th> <th>550 TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT</th> <th>560 560 Groft Gorri Groft Go</th> <th>570 570 consector consecto</th> <th>580 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800</th> <th>590 590 AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG</th> <th>600 ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO</th> <th>611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ</th>	Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consense (S12) Orobanche arenaria kolitet 1 from Bak/S00 Orobanche arenaria kolitet 1 from Bak/S00 Orobanche arenaria kolitet 2 from Bak/S00 Orobanche purgurea var. purgurea from Actrik(498) Orobanche purgurea var. purgurea from Actrik(498) Dorobanche purgurea var. purgurea from Georgia (Hema(498) iganche purgurea var. bohennica from Bak(497) Orobanche purgurea var. bohennica from Bak(497) Orobanche purgurea var. bohennica from Bak(497)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510 520 510 520 CONTRACTORONALISE 510 520 CONTRACT, SATURGORD CONTRACT, SATURGORD	530 STIGATOR CAAC STIGATOR CAAC SETTOR TO RCAAC SETTOR TO RCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC SETTOR CCAAC		550 TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGCTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT TIGTGA TT	560 560 Groft Gorri Groft Go	570 570 consector consecto	580 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800 784786800	590 590 AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG AAT GOTOCG	600 ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO ACTOCOTOCO	611 TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ TTCGATTGCGJ
Underdre evenluede solet 1 mm Iang(100) er Kantarka (1966) er Kantarka (1967) er Kantarka	Phelpanche ramosa internal transciele space i Conservation in Conservation (SSC) Orobanche arenaria transciele space i Orobanche arenaria tablet 2 from 184(SSO) Orobanche purpures ave, purpures from Acergie (188) Spanche purpures ave, purpures from Acergie (188) Orobanche purpures ave, purpures from Acergie (188) Orobanche purpures ave, purpures from Acergie (188) Orobanche purpures ave, bohomica isolate (1967) Orobanche purpures ave, bohomica isolate (1967)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510         520           511         520           520         520           521         520           521         520           521         520           521         520           520	530 530 IGTIGATI A CAACI IGTIGATI A CAACI IGTIGATI A CAACI IGTIGATI A CAACI IGTIGATI CCAACI IGTIGATI CCAACI IGTIGATI CCAACI IGTIGATI CCAACI IGTIGATI CCAACI IGTIGATI CCAACI		550 TTGCTGA TT TTGCTGA TT TTGCTGA TT TTGCTGA TT TTGCTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT TTGTGA TT	560 GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI GICICGOI	570 570 ccressore ccressor	580 580 TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO	590 590 AAT GOTOCGI AAT GOTOCGI		611 TTCGATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATGCG TTCCATGCG TTCCATGCG TTCCATGCG TTCCATGCG
Unbanche muteil ison Australisio)         ECASCINAL CLASSINGUE AND SEGUESTICS         ALACTOCII         ETTE         File and File an	Phelpanche ramosa internal transcited space 1 Consense (502) Orobanche arenaris kolte 1 from Bak/500 Orobanche arenaris kolte 1 from Bak/500 Orobanche arenaris kolte 2 from Bak/500 Orobanche arenaris kolte 3 from Bak/500 Orobanche purgurea var. purgurea from Austri4(498) Orobanche purgurea var. purgurea from Georgia (1980) Orobanche purgurea var. purgurea from Georgia (1980) Orobanche purgurea var. bohemica from Bak/497) Orobanche purgurea var. bohemica from Bak/497) Orobanche purgurea var. bohemica from Georgia (1997) Orobanche purgurea var. bohemica from Georgia (1997)	502 502 807070 80707 80707 80707 80707 80707 80707 80707 80707 80707 800	510 520 510 520 CONTRACTOROALASION 510 520 CONTRACT, ANTANOON CONTRACT, ANTANOON	530 530 SGTG&TG&CAAC SGTG&TG&CAAC SGTG&TG&CAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC SGTG&ACCCAAC	540 540 10000000000000000000000000000000	550 TTG CTGA TT TTG CTGA TT TTG CTGA TT TTG CTGA TT TTG TGA TG TTG TGA TG TTG TGA TG TTG TGA TG TTG TGA TT TTG TGA TTT TTG TGA TTT TTG TGA TTT TTG TGA TTT TTG TGA TTTT	560 GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI GICICGCI		580 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 784746400 78476600 7847600000000000000000000000000000000000	590 AAT GOTOCG AAT GOTOCG		611 TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATCCG TTCCATCCG TTCCATCGG TTCCATCGG
Orbanche muteli sizie 1 fom Spärlo         Crickortikal Construction         Construc	Phelpanche ramosa internal transcriede spacer i Cronevnas (502) Orobanche arenais internal transcriede spacer i Cronevnas (502) Orobanche arenais isobiet 1 from Ital(500) Orobanche arenais isobiet 2 from Ital(500) Orobanche purgues ave. Jourens from Accing(498) ispanche purgues ave. Jourens from Accing(498) ispanche purgues ave. Jourens from Accing(498) ispanche purgues ave. Johennia from Ital(497) Orobanche purgues ave. Johennia from Ital(497) Orobanche Impurges av. Johennia from Ital(497) Orobanche Impurges av. Johennia I from Ital(501) Orobanche I from Ital(501)	502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	\$10         \$20           \$10         \$20           \$10         \$20           \$20         \$20		540 540 eccess at an are eccess at an are eccess at a ar	550 TIGCIGA IT TIGCIGA IT		570 570 570 570 570 570 570 570 570 570	580 580 TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC TRATAGACC	590 590 AAT GOTOCGI AAT GOTOCGI		511 TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG TTCCATTCCG
Banke C. Agyptaz OK-2008 Hend Instructure. (200)         ECXACUTAZ C. SUBSTRUCTURE C. SUBSTRUE C. SUBSTRUCTURE C. SUBSTRUCTURE C. SUBSTRUCTURE	Phelpanche ramosa internal transcitet spacer Phelpanche ramosa internal transcitet spacer (562) Orobanche arenaris fom Germany(500) Orobanche arenaris kolter 1 fom 18/4(500) Orobanche arenaris kolter 2 fom 18/4(500) Orobanche arenaris kolter 2 fom 18/4(500) Orobanche arenaris kolter 2 fom 18/4(500) Orobanche purpurea vir. purpures fom Ausrig(498) banche purpurea vir. purpures fom Ausrig(498) Signiche purpurea vir. bohemic is kolter 1 (147) Orobanche purpurea vir. bohemic is kolter 1 (147) Orobanche lavanduces kolter 1 fom 18/4(500) Orobanche lavanduces kolter 1 fom 18/4(500) Orobanche lavanduces kolter 1 fom 18/4(500)	502 SO2 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510         520           511         520           000000000000000000000000000000000000	530 530 530 530 531 531 531 531 531 531 531 531 531 531	540 540 ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL ECCORT CONTROL	550 TIG TOAN IT TIG TOAN IT			580 580 TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC	590 S90 AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATTOTOCGI AATTOTOCGI AATTOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI		611 TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG
Observe d. norman 187 745 from Spar4(9)         CPC ADDR ADDR ADDR ADDR ADDR ADDR ADDR ADD	Phelpanche ramosa intermal transcriede spacer i Cronennas (502) Orobanche arenaria intermal transcrieder spacer i Orobanche arenaria inder 1 from Bar(500) Orobanche arenaria indete 1 from Bar(500) Orobanche purgurea var. purgense from Acrist(498) Orobanche purgurea var. purgense from Acrist(498) Orobanche purgurea var. purgense from Acrist(498) Orobanche purgurea var. bohenna from Bar(497) Orobanche purgurea var. bohenna from Bar(497) Orobanche purgurea var. bohenna from Bar(497) Orobanche Inpurgea transdie 1 from Bar(497) Orobanche Inpurgea transdie 1 from Bar(491) Orobanche mutel i from Astrifat(500) Orobanche mutel i from Astrifat(500) Orobanche mutel i from Astrifat(500)	502 SUPPORT SUPPORT S	\$10         \$20           \$10         \$20           \$10         \$20           \$20	520 520 520 520 520 520 520 520 520 520	540 540 ECCUPIC DI DI DI ECCUPICIO ECUPICIO ECU	550 TTOCTGAR TT TTOCTGAR TT	560 GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCGCC GCCCCCC	200 (00 (00 (00 (00 (00 (00 (00 (00	580 580 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400 7347563400	590 S90 RATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI AATGOTOCGI		511 TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG
sande oravina vouche heb. Sander Pedraj 12.(49)         Calcanza de Sandor C	Phelpanche mmosa 2 Phelpanche mmosa internal transcriede siguet 1 Convenses (502) Orobanche arenaris inform Germany(500) Orobanche arenaris isobite 1 from 18/4(500) Orobanche arenaris isobite 2 from 18/4(500) Orobanche arenaris isobite 1 from 18/4(500) Orobanche purpures vz. pupures 16 mol.excit(48) signache purpures vz. pupures 16 mol.excit(48) ispanche purpures vz. pupures 16 mol.excit(48) Orobanche purpures vz. pubernici from 18/4(47) Orobanche sizenduces isobite 1 from 18/4(500) Orobanche isranduces divisite 1 from 18/4(500) Orobanche divisite 06%2000 interna transcribe(500)	502 502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510         520           511         520           000000000000000000000000000000000000	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200		550 TIGCTOA IT TIGCTOA IT	560 69 CTC 60T 69 CTC 60T	300 (1990)      300 (1990)     300 (1990)	580 580 TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC TAATAGACC	590 590 590 590 590 590 590 590 500 500		611 TTCGATTCGJ TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG TTCGATTCGG
sindle rounder herb, Sacher Perigi 12, (49)       Critical Line Line Line Line Line Line Line Line	Phelpanche ramosa i termal transcriede spacer i Cronernas (502) Orobanche arenais intermal transcriede spacer i Cronernas (502) Orobanche arenais inabite 1 from 18/4(500) Orobanche purpures var. purpures from Georgië(498) Dandhe purpures var. purpures from Georgië(498) Dandher purpures var. purpures from Georgië(498) Dorobanche purpures var. purpures from Georgië(498) Dorobanche purpures var. bohemica from 18/4(577) Orobanche purpures var. bohemica from 18/4(577) Orobanche purpures var. bohemica from 18/4(577) Orobanche isvandukces abite 1 from 18/4(577) Orobanche muteil from Austrafe(500) Orobanche muteil from Austrafe(500)	502 SUP CONTENT SUP CONTENT	51         520           1000000000000000000000000000000000000	520 520 520 520 520 520 520 520 520 520	540 540 1000000 000000 000000 1000000 000000 00000 1000000 000000 00000 1000000 00000 100000000	550 TIGCTGAA ET TIGCTGAA ET	560 560 67 C 10 G 07 67 C 1	9- 570 570 570 560 560 560 560 560 560 560 560 560 56	580 580 TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC TARTAGACC	590 SATESTICA AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES AATESTICES		511 TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG TTCGATTCCG
Phelpanche rossativa istemi transcride (jusci (143))         Concentrativa istemi transcride (jusci (143)) <thconcentrativa (143))<="" (jusci="" istemi="" th="" transcri="">         Con</thconcentrativa>	Phelpanche ramosa intermal transcriede spacer 1 Convenses (502) Orobanche arenaria intermal transcrieder spacer 1 Orobanche arenaria intermativativativativativativativativativativ	502 502 ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA ACTCA	510         520           511         520           512         520           513         520           514         524           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 5		550 TTO CTGAR TT TTO CTGAR TT TTO CTGAR TT TTO CTGAR TT TTO CTGAR TT TTO TTO TTO TTO TTO TTO TTO TTO TTO TTO TTO	560 560 67 C C C C C 67 C C C C C 67 C C C C C C C 67 C C C C C C C 67 C C C C C C C C C C 67 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	9- 570 5- 570 5- 500 500	580 580 TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO TAATAGACO	590 590 AAT of TOCG AAT of TOCG		611 TTCGATTGG TTCGATTGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGG TTCGATGGGG TTCGATGGGG
barther of, aegyptikar HST 6611 sokle 1 from Gen., (49)         HCTANOTACK CENTRONOGUTUAL         SULVECTOR         Forth	Phelpanche ramosa i termal transcriede spacer i Cronernes (502) Orobanche arenais intermal transcriede spacer i Cronernes (502) Orobanche arenais isobie 1 form 184/500) Orobanche arenais isobie 1 form 184/500 Orobanche arenais isobie 1 form 184/500 Orobanche pupurea var. pupurea form Georgi (498) Jordbanche pupurea var. pupurea form Georgi (498) Orobanche pupurea var. bohemia form 184/457) Orobanche pupurea var. bohemia form 184/457) Orobanche sundukces alsiste 1 (497) Orobanche isvandukces alsiste 1 (497) Orobanche muteil form Austrafe(500) Orobanche under hen Sachter 2 form 124/4500 Austrafe oromativa vucher hen S. Sachter 2 eforta 1 24980 Janche oromativa vucher hen S. Sachter 2 eforta 1 24980	502 SOLO S	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	30     30     30     30     40		550 TIGCIGA IT TIGCIGA IT	560 560 67 c10 607 67 c10 6	9- 570 570 570 570 570 570 570 570 570 570	580 580 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 78427640000 7842764000 7842764000 7842764000 7842764000 78427640000 78427640000 78427640000 78427640000 78427640000 78427640000 78427640000 784276400000000000000000000000000000000000	590 590 ATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO AATTOTOCIO		611 TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG
adam on sugnees for sugnees for sugnees for sugnees and sugnees and sugnees for sugnees fo	Phelpanche ramosa intermal transcincelei spacer 1 (Convenses (S02) Orobanche arenaria form Germany(S00) Orobanche arenaria isolate 1 form 18/4(S00) Orobanche arenaria isolate 2 form 18/4(S00) Orobanche arenaria isolate 2 form 18/4(S00) Orobanche arenaria isolate 2 form 18/4(S00) Orobanche anyunera vis. purpues form Actrai(498) Orobanche purpuera vis. purpues form Actrai(498) Signache purpuera vis. purpues form Actrai(498) Signache purpuera vis. purpues form Actrai(498) Orobanche purpuera vis. purpues form Actrai(498) Signache purpues vis. Duennia form Astrai(497) Orobanche purpues vis. Duennia form Astrai(497) Orobanche lavanduaces table 1 form 18/4(S00) Orobanche elf and transcher Actraited Song/498) Janche oronarius avucher hen. Sancher 2040a 12(498) Janche oronarius avucher hen. Sancher 2040a 12(498)	502 502 80700 80700 807000 807000 8070000000000	510         520           511         520           512         520           513         520           514         524           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	23 53 53 54 54 54 54 54 54 54 54 54 54		550 TTO TORA T TTO TORA T		200 (200)     200	580 580 TAATAGACO	590 590 590 590 590 590 590 590 590 590		511 TTCGATTCGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ TTCGATTGGGJ
Partic Finish Moder Hen, V. S. Meter J. B. (1990) Exclamation consistence of the second state of the se	Phelpanche ramosa internal transcribed spacer i Croneneus (502) Orobanche arenais atternal transcribed spacer i Orobanche arenais table 1 from 24/500 Orobanche arenais table 2 from 14/500 Orobanche arenais table 2 from 14/500 Orobanche arenais table 2 from 14/500 Orobanche purpures van purpures from Georgia (498) Orobanche purpures van bunnes from Austrik (498) Orobanche purpures van bunnes from Austrik (498) Orobanche purpures van bohenica from 14/517) Orobanche purpures van bohenica from 14/517 Orobanche sundukces ablet 1 (1977) Orobanche isvandukces ablet 1 (1977) Orobanche isvandukces ablet 1 (1977) Orobanche mutei liforn Austrik (500) Orobanche mutei liforn Austrik (500) Orobanche rodei ta 1 from Zajk(500) Banche oromanis avoucher hen. Sanchez Pedraja 12. (498) panche oromanis avoucher hen. Sanchez Pedraja 12. (498) Phelpanche romana interna transcribed spacer (1968)	(1) ( 502 502 ACTCA	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	529 529 621%10 7 8 63AC 625%10 7 8 63AC 637%10 7 8 63C 637%10 7 8 637%10 7 8 63C 637%10 7 8 63C 637%10 7 8 63C 637%10 7 8 63C 63		550 TTGCTGA T TTGCTGA T T TTGCTGA T T T TTGCTGA T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		370 (2010)      370 (2010)     370 (2010)	580 580 78478426400 78478426400 78478426400 7847846400000000000000000000000000000000	590 590 AAT 60 TOCG AAT 60 TOCG		61 TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG TTCGATTGGG
Undanche of, and GR-2008 under hot. Imm (unequify) in Characteria Conference on Characteria Conf	Phelpanche ramosa intermal transcriede spacer 1 (noverness (noverness) (novern	(1) [ 502 502 8070 80702 8070 8070 8070 80702 80702 80702 80702 80702 807	510         520           511         520           2000         2000           2000	50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 5		550 TTG TGA TT TG TGA TT TG TGA TT TG TGA TA TG TGA TGA TT TG TG TGA TGA TT TG TG TGA TGA TT TG TGA TGA TT TG TGA TGA TT TG TGA TGA TT TG TG TGA TGA TT TG TGA TGA TG TG TGA TGA TT TG TGA TGA TG TG TGA TGA TG TG TGA TGA TT TG TGA TGA TG TG TGA TGA TT TG TGA TGA TG TG TGA TG TG TGA TG TG TGA TG TG TGA TG TG TG TG TGA TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG	560 G1 C1C 601 G1 C1C 601 G	200 (200)     200	580 TAATAGACC	590 590 590 590 590 590 590 590 590 590		fil TTCGATTCGJ TTCGATTCGG
Unbanche oxybos konz (1970)       PCLASCEARS CENERGISTER       ARTICCI I STETI ARA TOS I SCI DEL TENDER PLANTAL CALLANTAL CALLA	Prelipanche ramosa intermal transcribed spacer i Cronernes (502) Orobanche arenaris totter i from Zarky Orobanche arenaris totte i from Zarky Orobanche arenaris totte i from Zarky Orobanche arenaris totte i from Zarky Orobanche purpurea var. purpurea from Gergei (498) Orobanche purpurea var. bohenica from Alz(497) Orobanche purpurea var. bohenica from Alz(497) Orobanche purpurea var. bohenica from Alz(497) Orobanche isvandukcen zeit i from Alz(497) Orobanche murtei from Austrafic(500) Orobanche murtei from Austrafic(500) Orobanche murtei from Als(497) Orobanche murtei from Als(497) Orobanche murtei from Als(497) Orobanche murtei Isto from Saler (1978) sanche romanis avoucher henb. Sanche Pedraja 12. (498) panche orosanis vaucher henb. S	502 502 ACTCA	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	520 520 801%10 8000 800			560 560 GC CE GCT GC CE GCT G	9- 	580 TRATAGACO TATATAGACO TATATAGACO TATATAGACO TATA	590 590 ALTO TOCO ANT OF TOCO		SIL TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS TICGATIGGS
Orbanche onyble kolze 1 from Tusky(97)         VEX.4007.4.0.         VEX.5007.0.         STAT 100.	Phelpanche ramosa internal transched spacer 1 (502) Orobanche arenais internal transched spacer 1 (7000000000000000000000000000000000000	502 ACTCA	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510					570 570 570 570 570 570 570 570	580 TAATAGACC	590 590 ATGTTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGTCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI ATGCCCI		611 TTCCATTGGG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG
Ordanche oxybia bolate 2 from Tusky (49)       INCENDENCE - CENTROLOGIE -	Phelpanche ramosa intermal transcrited spacer i Cronennas (502) Orobanche arenais abtet 1 fom 24/500 Orobanche arenais tabet 1 fom 24/500 Orobanche arenais tabet 2 fom 124/500 Orobanche arenais tabet 2 fom 124/500 Orobanche anerais tabet 2 fom 124/500 Orobanche purpures av. purpures 1 fom 26/4500 Orobanche purpures av. purpure 1 fom 26/4500 Orobanche purpures av. bohenica 1 fom 124/4570 Orobanche purpures av. bohenica 1 fom 124/4570 Orobanche murkei 1600 a. 1515 fom 5par(480) Orobanche murkei 1600 a. 1515 fom 5par(480) Banche oromanis avouche rheb. Sanche Pedraja 12. (498) panche oromanis avouche rheb. Sanche Pedraja 12. (498) panche romanis avouche rheb. Ganche Pedraja 12. (498) panche	502 502 ACTCA	510         520           511         520           520         520           521         520           520	53 53 53 53 53 53 53 54 54 54 54 54 54 54 54 54 54 54 54 54				9- 	580 TRATAGACC TATACACC	590 SAATAS TOCG AAATAS TOCG		11 TICATIGATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA TICATICA
Bancker (J. nan GN-2008 vurder heb. Sancher	Phelpanche ramosa intermal transchede spacer (502) Orobanche arenais intermal transchede spacer (7000000000000000000000000000000000000	502 502 8070 80702	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	500 500 500 500 500 500 500 500 500 500				570 570 570 570 570 570 570 570	280 280 280 280 280 280 280 280 280 280	590 SARTISTOCI ANTISTOCI		611 TTCCATTGGG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG TTCCATTGCG
Orderate nam form Englight         Concentration of the second secon	Phelpanche mmosa intermal transcrited spacer I (502) Orobanche arenaris intermal transcrited international Orobanche arenaris international (500) Orobanche purpures vir. purpures from Geregen (500) Orobanche purpures vir. purpures (500) Orobanche purpures vir. purpures (500) Orobanche purpures vir. bohemica international (500) Orobanche purpures vir. bohemica international (500) Orobanche purpures vir. bohemica international (500) Orobanche lavanduces international (500) Orobanche (500) Orobanche (500) Orobanche (51) (500) Orobanche (500)	502 502 2010 20	510         520           511         520           520	52 52 52 52 52 52 52 52 52 52					520 520 520 520 520 520 520 520			611 TTCCATTGCG
Obtache nano sobie 1 fino Greec(#9)         Calculation Construction         Alatteria         Entry	Phelpanche ramosa intermal transcited spacer i (502) Orobanche arenais intermal transcited spacer i (convenses (convenses) Orobanche arenais isobie 1 from 18/4(500) Orobanche arenais isobie 2 from 18/4(500) Orobanche purpures are, purpures from Acerig(498) banche purpures are, bohemica isobie 1 from 18/4500) Orobanche purpures are, bohemica isobie 1 from 18/4500) Orobanche for Advisione mutei from Astaris(498) probleganche rosmania 1877 1511 sobie 1 from 548/500 Orobanche 1576 511 sobie 1 from 548/500 Probleganche rosmania 1876 511 sobie 1 from 548/500 Orobanche avyoba banche 1670 mutei 4970 Orobanche avyoba from Teeree(497) Orobanche avyoba sobie 1 from Tuek(497) Orobanche avyoba sobie 1 from Tuek(497) Orobanche avyoba sobie 1 from Tuek(497) Dorobanche avyoba sobie 1 from Tuek(497)	502 502 ACTCA	51         520           CORE ALL         CORE ALL           CORE ALL         CORE ALL </td <td>50 50 50 50 50 50 50 50 50 50</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>570 (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2)</td> <td>580 580 580 580 580 580 580 580 580 580</td> <td></td> <td></td> <td>611 TTCCATTCCG</td>	50 50 50 50 50 50 50 50 50 50				570 (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2) (2)	580 580 580 580 580 580 580 580 580 580			611 TTCCATTCCG
parche nana voucher heb. G 5558 internal trans(466) INTERACTORIS CITATORIS TELLE SUBJECTORIS TELLE SUBJECTORI SUBJECTORIS TELLE SUBJECTORIS TELLE SUBJECT	Phelpanche mmosa i termal transcincted spacer ( (502) Orobanche arenais intermal transcincted spacer ( (502) Orobanche arenais isolate 1 fom Ba/(500) Orobanche arenais isolate 2 fom Ba/(500) Orobanche arenais isolate 3 fom Ba/(500) Orobanche purpures var. pupures 1 fom Austra(148) ispanche purpures var. pupures 1 fom Austra(148) Orobanche lavanducas aubet 1 fom Ba/(500) Orobanche I sonducas inform Austra(148) Orobanche CA: orostman 1457 7615 fom Spair(490) anche orosmait voucher henh. Sanchez Pedraja 12(498) Phelpanche morso voucher henh. Sanchez Pedraja 12(498) Orobanche z - dispota kabach 601 from Tuekre(477) Orobanche oxybola sokie 1 from Tae/(477) Orobanche oxybola sokie 1 from Tuekre(477) Orobanche dra nater from Tuekre(477) Orobanche oxybola sokie 1 from Tuekre(477) Orobanche oxybola sokie 1 from Tuekre(477) Orobanche oxybola sokie 1 from Tuekre(477) Oro	502 ACTCA	210         520           510         520           521         520           522         520           524         520           525         520           526         520           527         520           528         520           529         520           520					Transfer         Paint           570         570           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           6         5500         70           7         5000         70           7         5000         70           7         5000         70           7         5000         70           8         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70           9         5000         70     <	520 520 520 520 520 520 520 520 520 520			611 TTCCATTGCG
<ul> <li>Orbande dr. and G. 30174 kold in Generg(49)</li> <li>Detector and the second an</li></ul>	Phelpanche ramosa intermal transcitede spacer i Cronences (502) Orobanche arenaria totto i form Ling (502) Orobanche arenaria totto i form Ling (502) Orobanche arenaria totto 2 form Ling (500) Orobanche purpures are, purpures from Accrit(498) Orobanche purpures are, bohemica totta E (1967) Orobanche purpures are, bohemica totta E (1967) Orobanche purpures are, bohemica totta E (1967) Orobanche nuclei form Astaci(498) Orobanche rundel totta obte 1 form Ling (496) Distanche (- anormania 1577) form Spar(498) pienden arensa voucher hen. Sancher Berdiga II(498) Phelpanche rosmania 1676 GII 1086 E (1967) Orobanche anybba solte 1 form Ling (497) Orobanche ana form Ling (496) Orobanche nana form Ling (496) Orobanche nana form Ling (497) Orobanche nana form Ling (497)	502 ACTCA	51         520           1000000000000000000000000000000000000					Transfer         Paint           200         20	580 580 580 580 580 580 580 580 580 580			611 TTCGATTGGG
Volencie c. nas do 9117 house 1 mill description of the product of	Phelpanche mmosa i termal transcriede spacer 1 (502) Orobanche arenaria intermal transcrieder spacer 1 (Convenues (502) Orobanche arenaria isolate 1 from 18/(500) Orobanche arenaria isolate 2 from 18/(500) Orobanche purpures vr. purpures from Corregio interna(498) Orobanche purpures vr. purpures from Austrief(498) siganche purpures vr. purpures from Austrief(497) Orobanche purpures vr. purpures from Georgio interna(498) Orobanche purpures vr. purpures from Georgio interna(498) Orobanche lavanduaces isolate 1 from 18/(500) Orobanche lavanduaces isolate 1 from 18/(500) Orobanche ch. Sancher Pedraja 12(498) pancher cansorbanet hendt Franscreiber 4000) Banche di anguta el 1515 from 5gar(498) sanche oranaria voucher henh. Sancher Pedraja 12(498) phelpanche morte el 1 from 18/(500) Orobanche el - di Isolate 1 from 18/(500) Orobanche ovybola solate 1 from 18/(500)	502 ACTCA ACTC	510         520           511         520           512         520           513         520           514         524           515         520           516         524           517         520           518         524           519         520           510				AFGORIGAN           560           Status           St	Transfer         Paint           270         270           270	520 520 520 520 520 520 520 520 520 520	590 590 590 500 500 500 500 500 500 500		
Unoranche dr. Inate us sessionale unon vessel (9) респлотовале съвлатовата с въястоска претит в на тора претит ведетова претит в въястоста сталовата на претит на претит в въястоста сталовата на претит в в прети	Phelpanche ramosa intermal transchede spacer i (normense (source) Orobanche arenaris abite 1 from 184/(SOU Orobanche anema is abite 1 from 184/(SOU Orobanche anupurea vir, purpures from Georgia Henna, (48) Orobanche purpures var, purpures from Georgia Henna, (48) Orobanche purpures var, purpures from Georgia Henna, (48) Orobanche purpures var, purpure 1 from 184/(57) Orobanche purpures var, bueneris from 184/(57) Orobanche purpures var, bueneris from 184/(57) Orobanche purpures var, bueneris 1 from 184/(57) Orobanche purpures var, bueneris 1 from 184/(57) Orobanche purpures var, bueneris 1 from 184/(57) Orobanche muteil from Austrafistion Orobanche muteil from Austrafistion Orobanche muteil from Austrafistion Orobanche muteil from Austrafistion Orobanche ander 1 from 184/(57) Orobanche naviel istel 1 from 184/(57) Orobanche avolter heft. Sancher Pedriga 12(49) Banche constrain straff 561 listoliste 1 from 184/(57) Orobanche ovybob solte 1 from 184/(57) Orobanche navis off from 184/(57)	502 502 ACTCA	51         520           2010         2010           2010					9	590 590 590 590 590 590 590 590 590 590			
Unbanche ramos fino Georgia (97) In CRAONTANG CRASSINGUTAR CRASSINGUTA	Phelpanche ramosa intermal transcinetel spacer (502) Orobanche arenaria intermal transcinetel spacer (7000000000000000000000000000000000000	502 502 ACTCA	510         520           0000-00000000000000000000000000000000						580 580 580 580 580 580 580 580 580 580	50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 5		61 TTCCATTCCG TT
Orobanche ramosa isolate Anti. 49(97) <u>ACTELADOTEANE CHARGEOGENELLE</u> ALACTECCET, LI TETTE GENE TES LI GETE TI DOGE TEXATANÀCE ALACTECOLOCITICATECC Phelpanche ramosa 19(97) <u>ACTELADOTEANE CENTRODOTEANE</u> CAACTECCET, LI TETTE DEL TOTA E DOGE TEXATANÀCE ALACTECIDENCETICATECC Phelpanche ramosa intendi transcribed space 1 (497) <u>ACTELADOTEANE CENTRODOTEANE</u> ALACTECCET, LI TETTE DEL TEXAT TOCA E CENTRODOTECHICON Phelpanche ramosa intendi transcribed space 1 (497) <u>ACTELADOTEANE CENTRODOTEANE</u> ALACTECCET, LI TETTE DEL TEXAT TOCA E CENTRODOTECHICON Phelpanche ramosa intendi transcribed space 1 (497) <u>ACTELADOTEANE CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> Phelpanche ramosa intendi transcribed space 1 (497) <u>ACTELADOTEANE CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON <u>CENTRODOTECHICON</u> <u>CENTRODOTECHICON </u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u>	Phelpanche ramosa intermal transcriede spacer i (non-nos. (soc) Orobanche arenaria intermal transcrieder spacer i (non-nos. (soc) Orobanche arenaria inter i from Early(soc) Orobanche purpurea var. purpures from Georgia Heima. (498) Orobanche purpurea var. purpures from Georgia Heima. (498) Orobanche purpurea var. bohenna from Early(soc) Orobanche nureli form Austrieffes) Orobanche muteli form Austrieffes) Orobanche anyba bohet I from Early(soc) Orobanche anyba bohet I from Early(soc) Orobanche onyba bohet from Tuerk(syff) Orobanche onyba bohet I from Tuerk(syff) Orobanche nan kolite I from Tuerk(syff)	502 ACTCA	510         520           511         520           512         520           513         520           514         520           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510	529 529 621102 5 63AC 529 621102 5 63AC 539 624 625 625 625 625 625 625 625 625 625 625				Toronto         Pair           2         200 <td>590 590 100 100 100 100 100 100 100 1</td> <td>59 59 59 59 59 59 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50</td> <td></td> <td>611 TTCCATTCGC TTCCATT</td>	590 590 100 100 100 100 100 100 100 1	59 59 59 59 59 59 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50		611 TTCCATTCGC TTCCATT
Phelpanche ramos (1997) <u>Artichante de Characteriste de Cantonne d</u>	Phelpanche ramosa intermal transcincelei spacer I (novenness (novenness) (nove	502 ACTCA ACTC	510         520           511         520           512         520           513         520           514         524           515         520           516         524           517         520           518         524           519         520           510	- Anaroveresearch           - 530					580 580 580 580 580 580 580 580 580 580	59 59 59 59 59 59 59 59 59 59		61 TCCATTCG TC
Phelpanche ramosa 2(497) le trackotecker echerosonartical la state contra solari e sort e reade retratavance la response to an experimentation of the source construction of the source	Phelpanche mmosa i terma i transcrited spacer (1 Convensor (552) Orobanche arenaris inform Germany(500) Orobanche arenaris inform Germany(500) Orobanche arenaris inform Eay(500) Orobanche arenaris inform Eay(501) Orobanche purpures vr. purpues from Geregen informa. (1988) Signache purpues vr. purpues from Geregen informa. (1989) Grobanche purpures vr. purpues from Geregen informa. (1989) Orobanche purpues vr. bohemic inform Eay(501) Orobanche purpues vr. bohemic inform Eay(501) Orobanche lavanduces inform Astratictes Jorobanche dr. oromanna Hort Matsoret Banche Sanger (1988) anche orosanius voucher henb. Sancher Pedragi 12. (1988) Drobanche ch. Sancher Pedragi 12. (1988) Orobanche ether G. Sancher Pedragi 12. (1988) Orobanche ether G. Sancher Pedragi 12. (1988) Orobanche exopta babach 661 from Turkey(497) Orobanche onyoba babach 10 from Gerece(4950) Orobanche endo sobat balar 11 from Sanger(498) Dorbanche exopta babach 61 from Turkey(497) Orobanche exopta babach 61 from Turkey(497) Orobanche endo sobat balar 11 from Sanger(498) Drobanche endo sobat balar 11 from Taece(4950) Orobanche endo sobat 51 from Tae(4970) Orobanche endo sobat 51 from Taece(4950) Orobanche endo sobat 51 from T	502 3070	510         520           511         520           521         520           522         523           523         524           524         525           525         525           526         525           527         525           528         525           529         525           520         525           520         525           520         525           520         525           520         525           520         525           520         525           520         526           520         526           520         526           520         526           520         526           520         526           520         526           520         526           520         526           521         526           521         526           521         527           521         527           521         527           521         527           521						520 1422 1	590 590 590 590 590 590 590 590 590 590		
Phelpanche ranosa internal transcribed spacer 1(497) ACTOACOSTACOGOS TRACEGOSTIGAL CLAARCOCCCCCC CT STOTTE CALL TEST ST SCT SCT SCT SCT SCT SCT SCT SCT SC	Phelpanche ramosa intermal transchede spacer (502) Orobanche arenais antermal transchede spacer (7000000000000000000000000000000000000	502 502 8070 80702	510         520           511         520           512         520           513         520           514         524           515         520           516         520           517         520           518         520           519         520           510						580 580 580 580 580 580 580 580 580 580	59 59 59 59 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50		611 TCCATTCG T
	Phelpanche mmosa i terma i trancrictel siguer 1 (Convenues (Convenues) (Conven	502 502 2017 20	210         220           211         220           222         223           223         223           224         224           225         224           226         224           227         224           228         224           229         224           220						520 1427 2620 1427 2	590 590 590 590 590 590 590 590 590 590		
	Phelpanche ramosa intermal transchede spacer (502) Orobanche arenais abite 1 from 184/500 Orobanche arenais abite 1 from 184/500 Orobanche arenais abite 1 from 184/500 Orobanche arenais abite 2 from 184/500 Orobanche arenais abite 2 from 184/500 Orobanche angurae site 1 from 184/500 Orobanche purpures 47, purpure 5 from 184/500 Orobanche sindukera sibet 1 from 184/500 Orobanche from 456 fil 51 foots from 184/500 Orobanche from 5 fil 51 from 5 pai/498 Janche companie 5 fil 51 foots 1 from 5 pai/498 Janche companie 5 fil 51 foots 1 from 5 pai/498 Janche companie 5 fil 51 foots 1 from 184/500 Orobanche navibuel from 5 anchez 1 from 184/500 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 5 anchez 1 from 184/500 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 184/501 Orobanche navibuel from 5 anchez 1/501 Orobanche from 6 and 501 from 184/501 Orobanche from 6 and 501 from 6 from 6 from 6 and 501 From 6 and 6 and 501 from 6 from 6 from 6 and 501 Orobanche from 6 and 501 from 6 from 6 from 6 and 501 Phelpanche from 6 and 501 from 6 from 6 and 501 Orobanche fro	502 2017 2	131         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           132         200           133         200           134         200           135         200           134         200           135         200           135         200           135         200           136         200           136         200           137         200           138         200           139         200           130         200           130	500 500 500 500 500 500 500 500 500 500					580 580 580 580 580 580 580 580	59 59 59 59 59 59 59 59 59 59		611 TCCATTCG T

Фиг.2. Множествен алайнмент на секвенциите на гените кодиращи 18Sи 26S рРНК

#### 2.1. Изолиране на ITS1/2 региона посредством PCR

Средно по 150 ng от изолираните ДНКи бяха използвани като матрица за PCR с праймерите за ITS1/2. Получени са продукти с очаквания размер, които са разделени посреством 1% агарозен гел.

#### 2.2. Секвениране

Получените в резултат на PCR реакцията продукти са изрязани от гела с чист скалпел. Пречистването им е извършено посредством QIAquick Gel Extraction kit следвайки оригиналния протокол на Qiagen. Част от продуктите са изпратени за директно секвениране, а друга са клонирани в pDrive вектор, намножени в E.coli и след това изолирани и изпратени за секвениране отново в GATC Biotech AG – Германия.

#### 2.3.Биоинформатичен анализ

Получените секвенции са експортирани в програмата MEGA 7 за да бъдат сравнени с официално анотираните в NCBI.

Първоначално за да калибрираме параметрите на програмата използвахме анотираните в NCBI секвенции. Най-подходящ се оказа алгоритъма Maximum likelyhood. Получената филограма ясно различава двата вида в род Phelipanche (фиг. 3). Наблюдаваното групиране на видовете не съответстваше на основната таксономична схема, както и на резултатите представени в по-ранна публикация на Schneeweiss и сътрудници (2004). За наша изненада *P. mutelii* се групираше с *P. rosmarina*, по тази причина за изследванита бяха използвани само семена, които със сигурност принадлежаха към *P. ramosa*.



Фиг. 3. Филогенетично дърво на изолираните от нас и анотираните в NCBI секвенции на видове от род Phelipanche

#### 3 Скриниране за устойчиви линии на активационни мутантни на Arabidopsis

През първият етап работихме в едно основно направление: Чрез използване на подхода Forward genetics (FG), проведохме скриниране най-голямата в света колекция на aктивационни мутантни линии на *Arabidopsis* (CS 31000), която практически обхваща целия геном на pactenueto.

Откритите през първия етап устойчиви мутантни линии ни позволиха през втория етап да идентифицираме ключовите гени и ензимнокатализирани стъпки регулиращи:

1. Биосинтезата на химичните сигнали обменяни между гостоприемника и паразита, регулиращи прорастването на семената на Orobanche spp.

2. Реакциите на гостоприемника по време на инвазията на паразита и формирането на хаусториална връзка

3.1. Първоначално скриниране на цялата колекция от активационни мутанти и подбиране на индивидуални линии устойчиви срещу опаразитяване със синя китка (P. ramosa L.)

За първо скриниране на активационните мутантнти бяха необходими 1500 кв. м. площ. Тъй като на територията на АБИ и ПУ "П. Хилендарски" не разполагаме с толкова голяма площ. Наложи се да наемем допълнително две оранжерии в Съвместния геномен център (СГЦ) при биологическия факултет на СУ "Св. Климент Охридски" и да проведем първото скриниране в три отделни последователни етапа.

Скринирането бе извършено чрез отглеждане на растенията Arabidopsis на заразена със семена на *P. ramosa* (L) почва съгласно със системата разработена от Denev et al. (2007).

Семената на мутантните линии *Arabidopsis* (CS 31000) и ни бяха доставени на 200 групи съдържащи средно по 310 линии ТЗ поколение. Пуловете бяха разделени между ПУ и АБИ за да можем да проведем паралелно скринирането.



Фиг. 4. Първоначално отглеждане на мутантните линии в петриеви блюда с MS агар

От всеки от пуловете бяха взети по 3100 семена (≈ 10 семена от линия). Семената бяха подложени на повърхностна стерилизация следвайки следния протокол: първоначално семената бяха промивани за 30 сек със 70% етанол с цел да отстранил микроорганизмите прилепени към липоидните вещества на повърхността на семето. След това се извършваше основната стерилизация чрез потапяне на семената за 10 мин в 4% р-р на натриев хипохлорид съдържащ 0,2% Tween 20. За да отстраним детергента следваше повторно промиване в 70% етанол за 30 мин. Остатъците от натриевия хипохлорид бяха отмивани чрез трикратно инкубиране на семената за по 10 мин. в стерилна дестилирана вода. Семената бяха засаждани в 15 см стерилни петриеви блюда съдържащи 0,8% MS агар. Блюдата първоначално бяха поставяни в хладилник при 40 С с цел принудително прекъсване на покоя и синхронизация на покълването, а в последствие бяха отглеждани за 12-14 дни в климатична камера (температура 20 - 220 С, режим 14 ч светлина/10 ч тъмнина). Пониците (фиг. 4) бяха внимателно отделяни от повърхността на MS агара и пресаждани в терините с опаразитената почва (фиг. 5). Всеки поник беше засаждан в отделна позиция в 100 позиционни терини. Този подход и позволи значително да съкратим времето за търсене на индивидуални устойчиви линии.



Фиг. 5. Скриниране на колекцията цялата колекция от активационни мутанти на Arabidopsis за устойчивост към синя китка

След приключване на експеримента семената от контролните растения бяха събирани за поддържане на семенна банка. При отчитане на резултатите освен показателите развитие и цъфтеж като селекционни маркер, след събиране на семената, проверявахме корените на опитните растенията за опаразитяване.

Растенията по чиито корени бяха открити прикрепени паразити на различен етап от развитие бяха изключени от по-нататъшната селекция.

В резултат на първото скриниране от общо отгледани 640 000 индивидуални растения бяха установени 1218 растения по чиито корени не открихме прикрепени паразити.

Тази цифра макар да предствавлява само 0,2% от всички отгледани растения се огромна.Не е възможно да има 1218 различни мутации, които да повлияват взаимодействието на паразита и гостоприемника. В този случай са вероятни две хипотези:

1) Като имаме в предвид че активационния инсърт влияе на експресията на гени разположени на растояние до 5000 н.д. от мястото на вмъкване на конструкта е възможно част от растенията да имат конструкти разположени на приблизитално едно и също място.

2) Възможно е част от растенията да не са устойчиви към синя китка, а поради аберации в условията на отглеждане те да са останали неопаразитени.

На този етап приехме че двете хипотези не са противоречии, а взаимно допълващи се поради което решихме да проведем не едно, а две последователни скринирания за да подберем индивидуални фенотипи, които са наистина устойчиви на опаразитяване.

4. Скриниране на устойчивите индивидуални линии за потвърждаване на устойчиви мутантни фенотипи и проследяване разпадането на признаците

Средно по 50 семена от растенията в опитните варианти бяха използвани за второто скриниране. То беше проведено по същата схема с тази разлика че сега ползвахме 50-позиционни терини (фиг. 6), а степента на опаразитяване на почвата беше 100 мг семена/литър почва.



Фиг. 6. Скриниране на индивидуални линии активационни мутанти на Arabidopsis за устойчивост към синя китка

При отчитане на резултатите отново използвахме показателите скорост на развитие, време цъфтеж спрямо контролата ниво на опаразитяване на корените на опитните растенията. Както ясно се вижда на фиг. 7 и 8 само в отделни терини (в една терина всички семена произхождат от едно растение) растенията се развиха напълно и формираха цветове и семена. В повечето терини макар растенията да формираха листна маса на успяха в рамките на 8 седмици да формират цветоносни стъбла и семена. Тези секвенции обаче саполучени от образци интродуцирани заедно с културните растения –служещи за техни гостоприемниците.



Фиг. 6 и 7. Второ и трето скриниране скриниране на индивидуални линии активационни мутанти на Arabidopsis за устойчивост към синя китка

Общо в резултат на цялостно скриниране колекцията от активационни мутанти на Arabidopsis бяха подбрани 36 индивидуални генотипа, устойчиви срещу опаразитяване от синя китка, принадлжащи на четири изходни пула линии.

Интерес за изследванията представляват линиите при които при три последователни поколения не се установяват опаразитяване. Причина за това може да бъде че са повлияни гени които причиняват отклонения в продукцията на стимуланти на прорастването (СП) или блокират формирането на хаустория.

# 5. Анализ по методът на Magnus на устойчивите индивидуални линии с цел разграничаване на тези с промяна в продукцията на СП от тези устойчивите срещу инвазията на паразита

#### 5.1. Отглеждане на Arabidopsis:

Семената на мутантните линии и контрола от див тип Col0 бяха стерилизирани с последователно инкубиране в следните разтвори: Първоначално семената бяха промивани за 30 сек със 70% етанол с цел да отстранил микроорганизмите прелипени към липоидните вещества на повърхността на семето. След това се извършваше основната стерилизииция чрез потапяне на семената за 10 мин в 4% р-р на натриев хипохлорид съдържащ 0,2% Tween 20. За да отстраним детергента следваше повторно промиване в 70% етанол. Остатъците от натриевия хипохлорид бяха отмивани чрез трикратно инкубиране на семената за по 10 мин в стерилна дестилирана вода. Семената бяха отглеждани в стерилни многопаничкови блюда върху 1.5 см дискове стъклена филтърна "хартия". Филтърната подложка беше напоена стерилна ½ MS среда. Блюдата първоначално бяха поставяни в хладилник при 40 С с цел принудително прекъсване на покоя и синхронизация на покълването, а в последствие бяха отглеждани за 12-14 дни в климатична камера (температура 23 - 250 С, режим 14 ч светлина/10 ч тъмнина). След това растенията внимателно баха отделяни от хартията и прехвърляни в нови стерилни много паничкови блюда съдържащи по 500 мкл стерилна дестилирана вода във всяка паничка. Там растенията престояваха за 24 ч при същите условия. Водата съдържаща кореновите отделяния респ. СП, разреждахме и използвахме за екприметите. Тъй като количеството на СП е изкключително ниско детекцията им с аналитична апаратура не е възможна. Единствената възможност да оценим присъствието на СП беше да третираме с тях предварително подготвени семена на синя китка. Подготовката беше извършвана по начина описан по-долу. Свежото тегло на растенията се определяше и се правят разреждания с цел да се постигне еднакво съотношение (тегло на растенията)/(обем на водата със СП) преди да започнат тестовете за прорастване.

#### 5.2. Тестване за прорастване на семена от синя китка:

Семената на Phelipanche ramosa се стерилизират чрез инкубиране за 10 мин в раствор на натриев хипохлорид а 0,2% Tween 20. Семената се измиват с стерилна дестилирана вода, разпределят се равномерно върху стерилни 1 ст дискове от стъклена филтърна хартия и всеки един диск се покрива с подобен (Mangnus et al. 1992, Denev et al., 2007a, b). Така изготвените "сандвичи" се навляжняват със стерилна дестилирана вода и се инкубират на тъмно при 26°С за 14 дни (Mangnus et al. 1992). Тестовете се провеждат като "сандвичите" се омокрят в водата със СП събрана съгласно както е описано в т. 5.1. След инкубация на семената за 7 дни при 26°С се определя количеството покълнали и непокълнали семена и се сравнява с дивия тип и с положителната контрола - 0,4 мг/л р-р на синтетичния стимулант на покълването GR24.

Резултатите от тестване за прорастване на семена от синя китка са представени в усреднен вид на фигура 8.



Фиг. 8. Усреднени данни за покълването на семена на Р. гатоза третирани с коренови излъчания ,събрани от устойчиви на опаразитване активационни мутанти на

#### Arabidopsis

# 6. Биоинформатичен анализ и изготвяне на праймери съответстващи на методичните изисквания на TAIL-PCR метода:

За изготвяне на специфичните праймери е използвана картата на плазмида посредством който са създадени активационните линии pSK1015. Известно е, че при трансформацията в генома на всяка една активационна линия се интегрира фрагмент от плазмида фланкиран от лявата (LB) и дясната (RB) граница, както е представено на схемата в литературния обзор. Генът за хербицидна устойчивост (BAR) се намира приблизително в средата на конструкта, а активационната касета е локализирана в дясната граница на конструкта. За нуждите на TAIL-PCR се използва лявата граница на конструкта.

Секвенцията на конструкта в близост то лявата граница е използвана на направата на четирите специфични праймера (SP1/SP2/SP3/SP4), разположението на които е представено на фиг. 9

-	• •
7601	TGCACATGGC TCAGTTCTCA ATGGAAATTA TCTGCCTAAC CGGCTCAGTT CTGCGTAGAA ACCAACATGC
	AAGCTCCACC GGGTGCAAAGCGGCAGCGGCGGCAGGATAT ATT=Left Border CAATTGT AAATGGCTTC
	ATGTCCGGGA AATCTACATG GATCAGCAAT GAGTATGATG GTCAATATGG AGGAAAAGAA AGAGTAATTA
7801	CCAA = LB4 TTTTTT TTCAATTCAA AAATGTAGAT GTCCGCAGCG TTATTATAAA ATGAAAGTAC
	ATTTTGATAA AACGACAAAT TACGATCCGT CGTATTTATA
7901	GGCGAAAGC = LB3 A ATAAACAAAT TATTCTAATT CGGAAATCTT TATTTCGACG TGTCTACATT
	CACGTCCA =LB2
	AA TGGGGGCTTA GATGAGAAAC TTCACGATCG
8001	ATATCTAGAT CTCGAGCTCG AGATCTAGAT ATCGATAAGC TTGCATGCCT
	GCAGGTCCTG CTGAGCCTCG ACATGTTGTC = LB1 TTCG CCCTGGACCC

Фиг. 9. Карта лявата граница на активационния конструкт pSKI015.Местата на праймерите са означени с различен цвят.

#### 7. Определяне на броят на Т-ДНК инсъртите Southern blot

Преди да пристъпим към TAIL-PCR, определихме броя Т-ДНК инсърти във всяка една от изследваните 36 линии. За целта използвахме Southern blot с не радиоактивно белязване. Като проба използвахме фрагмент от BAR гена в Т-ДНК инсърта с размер 850 н.д.

#### 7.1. Биоинформатичен анализ

За изготвяне на специфични праймери за BAR гена използвахме анотираната в NCBI пълна карта на вектора pSKI015. С цел уточняване на позициите на секвенциите картата на вектора беше конвертирана във формат за програмата Vector NTI 11. Генът BAR е част от оригиналния конструкт на Weigel и сътр. вмъкнат в вектора pSKI015 (Weigel *et al.*, 2000). Секвенцията на BAR гена е представена в червено на фиг. 10. Бяха избрани по два прави и обратни праймера нуклеотидни последователности с дължина 25 бази, които да служат като специфични праймери за амплификацията на BAR гена. Праймерите бяха така подбрани, че изолирания фрагмент от гена да е достатъчно дълъг за да послужи за проба за Southern blot анализ.

#### Лява граница на pSKI015

#### Праймер BAR-Fw1

CGGAGAATATTATTCATAAAAATACGATAGTAACGGGTGAT<mark>ATATTCATTAGAATGAACCGAAACC</mark>GGCGGTAAGGATCTGAGCTACACATGCTCAG GTT

#### Праймер BAR-Fw2

CCATTAACAACATTTTTATCTCGAGAATATGAGCTCCTTAAGCGATCTCAGCTAAACCACATAGCTCTA

#### Праймер BAR-Rev1

 $\label{eq:accast} ACCAATACTTTAAGTCTACGATCACATTACAATTGGTAATTTGGGAAGAATATAATAGGAAGCAAGGCTATTTATCCATTTCTGAAAAGGCGAAATGGCGTCACCGCGAGCGTCACGCGCATTCCGTTCTTG$ 

Фиг. 10. Фрагменти от Т-ДНК на инсърта от конструкта pSKI015 с означени позиции на праймерите

#### 7.2 PCR амплификация на региона на BAR гена

PCR реакциите са провеждани с използването на 2 комбинации специфични праймери (BAR F1/BAR R1 и BAR F2/BAR R2),.

РСR реакциите са провеждани при следните условия: във всяка проба са смесвани 2 мкл геномна ДНК, по 1 мкл от праймерите в комбинации BAR F1/BAR R1 или BAR F2/BAR R2 с работна концентрация 10 pmol; 12,5 µl PCR master mix и 8,5 µl ddH<sub>2</sub>O.

Получените продукти на PCR реакция са разделени на 1 % агарозен гел. Резултатите, представени на Фиг. 11А показаха, че и двете праймерни комбинации дават PCR продукти с очакваните размери. За изготвяне на ДНК проба беше избрана праймерната комбинация BAR F1/BAR R1, защото дава продукт с по-голям размер и респ. пробата ще има по-висока специфичност. Продуктът на последната праймерна комбинация беше изрязан от гела и изолиран посредством Gel extraction кит на фирмата Qiagen.



Фиг. 11. Електрофореза (в 1 % агарозеп ) па т СП продуктите от амплификация на ВАП гена (А) и на хибридизационната ДНК проба (Б).

1 µl от изолирания PCR продукт беше ползван като матрица за нова PCR реакция, имаща за цел да ни даде по-висок добив от пробата. Полученият продукт е пречистван от праймерите, нуклеотидите и останалите компоненти на PCR реакцията посредством 1 % агарозен гел (Фиг. 11 Б), от който пробата беше изрязана и изолирана отново чрез Gel extraction кит (Qiagen).

# 7.3.Нерадиоактивно белязване на хибридизационната ДНК проба с Dig-11-dUTP (PCR-DIG Probe Synthesis Kit, Roche)

Пробата за Southern blot беше белязана посредством PCR реакция. За целта се използваше PCR смес изготвена по протокола предоставен заедно с кита на Roche. Главната особеност на PCR сместа в опитните проби е че част от dTTP са заменени с Dig-11-dUTP (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche). За белязване на пробата е използвана праймерна комбинация BAR F1/BAR R1. Като позитивна контрола е използвана PCR смес не съдържаща Dig-11-dUTP. 5  $\mu$ l от продуктите на опитната и контролната PCR реакции бяха разредени с 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O и анализирани на 1% агарозен гел (Фиг. 12), а останалата част е пречистена от праймерите и нуклеотидите с PCR purification kit на фирмата Qiagen и използвани за Southern blot хибридизация.



Фиг. 12. Електрофоретично разделяне на 1 % агарозен гел на белязаната с Dig-11dUTP хибридизационна проба съпоставена с контролата

#### 7.4. ДНК хибридизационен анализ на устойчиви линии.

За целта изолираната геномна ДНК беше подложена на рестрикционно фрагментиране с помощта на рестрикционния ензим EcoRI (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) за 24 часа при температура 37°С (по указание на фирмата производител).

ДНК фрагментите бяха разделени електрофоретично на 1% агарозен гел в 1х ТАЕ (3.75mM Tris, 1M EDTA, 2mM натриев ацетат) за една нощ при напрежение 20-25 V (Фиг. 20).



Фиг. 13. Електрофоретично разделяне на 1% агарозен гел на фрагментирана посредством рестриктаза EcoRI геномна ДНК.

ДНК хибридизационния анализ беше повторен четирикратно, като са използвани 4 независими изолирания на геномна ДНК от устойчиви срещу синя китка мутанти на *Arabidopsis thaliana*. Резултатите показаха че растенията от 32 устойчиви линии притежават в генома си единично копие на BAR гена и респ. на Т-ДНК инсърта (Фиг. 14).

Анализа на растенията от останалите 4 линии не даде еднозначни резултати. Предполагаме че в две от тези линии инсърта е представен на повече от едно място генома (Фиг. 14). В други две линии въобще нямаше хибридизационен сигнал. Тези генотипи не бяха подлагани на TAIL-PCR защото не се очакват достоверни резултати.



Фиг. 14. Southern blot с геномна ДНК изолирана от устойчиви към опаразитяване линии Arabidopsis

#### 8. Провеждане на TAIL-PCR реакциите

Геномна ДНК от всички 32 индивидуални линии е използвана за провеждане на TAIL-PCR реакциите. Условията и използваните PCR програми са взети от разработеният от Liu et al., (1995), Liu and Whittier, (1995) TAIL-PCR протокол.

Продуктите от третия TAIL-PCR бяха разделени посредством 1% агарозен гел. и визуализирани в гел документираща система посредством UV светлина (фиг. 15).

След документиране геловете бяха прехвърляни на отделен трансилюминатор и ясно различимите ивици продукти бяха изрязвани от агарозния гел с помощта на чист скалпел. За очистване на продуктите от агарозата и примесите използвахме съгласно указанията на секвениращата компания кит Qlaquick на Qiagen.



Фиг. 15. Типична снимка на продукти от TAIL-PCR реакция разделени на агарозен гел

Секвенирането на TAIL-PCR продуктите е извършено паралелно в GATC Ltd. Германия и от проф. James Westwood в Центъра по Приложна геномика и Биоинформатика към Virginia Polytechnic Institute and State University USA. Изпратени бяха за секвениране в 4 повторения всичките TAIL-PCR продукти получени от 32<sup>-те</sup> устойчиви мутантни линии. Получените секвенции бяха подложени на биоинформатичен анализ.

**Получените секвенции** бяха сравнени с наличните в Arabidopsis database – TAIR и NCBI, за да се определи точната позиция на инсъртите в генома и установи кои гени за разположени в близост и са повлияни. Използван е алгоритъмът на nblast.

В обобщен вид получените данни да сумирани в таблица 5.

Списък на идентифицираните места на интеграция на активационния Т-ДНК инсърт. Първата цифра при тестваните в България мутанти означава изходен генотип, а останалите две цифри номер позицията на индивидуално растения при съответно второ и трето скриниране

	Ipc	то скриниранс	
Генотип тестван в	Генотип	Номенклатурен код на	Хромозома/
България	тестван в	генния участък	Позиция
	USA	(по NCBI)	
35-3	26_A7	AL161576	Хромозома 5
			8093325
35-4	26 H6	AL161576	Хромозома 5
			8093329
35-5	22 D4	AL161576	Хромозома 5
55 5	22_0	THE TOTS / O	8093341
36.6	22 E3	AL 162071	Vppwpppwg 5
50-0	22_03	AL102771	0200652
27.5	22 D2	1 0005707	9399033 Viceo of 5
57-5	22_D3	AC005727	Аромозома 5
20.4	<b>22 5</b> 2	4 0000 000	19128001 (knock-out)
38-6	22_F3	AC003680	Хромозома З
			11084955
			(knock-out)
57-6	22_B4	AC005700	Хромозома 3
			7827672
			(knock-out)
58-8	22_E6	AC034107	Хромозома 5
			8092735
59-5	22 D6	AC034107	Хромозома 4
	_		116953391
85-3	22 F6	AB005237	Хромозома 5
			1707856
85-4	22 B6	AB005237	Хромозома 5
05 4	22_00	1110003257	1707856
95 5	22 111	A D 005227	Vnov0000 5
83-3	22_ <b>H</b> I	AB003237	Аромозома 5
05.6	22,112	A D005227	1/0/838
83-0	22_H2	AB005257	хромозома 5
05.0		1.0005005	1/0/865
85-9	22_H3	AB005237	Хромозома 5
			1707878
86-2	22_H4	AB026658	Хромозома 5
			3520278
86-12	26_H7	AY077665	Хромозома 3
			6328142
			(knock out)
87-14	26_G7	AC034107	Хромозома 1
			23779035
			(knock out)
87-17	22_A4	AC034107	Хромозома 1
			23779017
			(knock out)
87-26	22 A5	AC034107	Хромозома 1
			23779035
			(knock out)
87-28	22 H8	AC03/107	Xpowozowa 1
07 20	22_110	110054107	23779041
			(knock out)
80.0	22 C4	AL 161540	(KHOCK OUT)
89-9	22_04	AL101340	Аромозома 1
90.19	22 54	AL 161540	0231362 Variation 1
89-18	22_F4	AL161540	лромозома I
			6231582
85-6	22_E4	AB026658	Хромозома 2
			13706578
85-6	22_E7	AB005237	Хромозома 2
			18782101
89-11	26_C6	AB005237	Хромозома 2
			18782189

91-3	26_D6	AB005237	Хромозома 2
91-16	26 H5	AB005237	Хромозома 4
51 10	20_115	110003237	14703340
			(knock out)
97-2	22_B5	AB005237	Хромозома 4
			14703340
			(knock out)
97-4	26_A6	AB005237	Хромозома 4
			14703323
			(knock out)
99-5	22_C4	AB005237	Хромозома 4
			14703376
			(knock out)
99-25	26_F8	AB005237	Хромозома 4
			14703348
			(knock out)
99-26	26_B6	AB005237	Хромозома 4
			14703344
			(knock out)

Данните ни позволиха еднозначно идентифицираме местата на Т-ДНК конструктите за 32 от устойчивите генопити. При част от генотипите Т-ДНК инсъртите са приблизително на едно и също място. Това не е изненада защото не можем да очакваме огромно количество гени да влияят върху устойчивостта срещу опаразитяване със синя китка. Повторенията на определени локации всъщност увеличава вероятността повлияните гени действително да допринасят за повишаване устойчивостта срещу опаразитяване. Вижда се че в почти 50% от случаите активационните Т-ДНК инсърти са в кодиращата секвенция на някои от гените. Това потенциално значи, че тези гени са изключени (knock-out) защото инсърта е с дължина почти 10 килобази и съдържа терминаторни секвенции, които блокират експресията. Това обаче не означава, че съседните гени не са активирани. В други случаи Т-ДНК попадат в зони, които макар да са секвенирани все още на са типизирани окончателно. Освен това не винаги гените в близост до енхансерите в Т-ДНК инсърта са тези, които имат отношение към наблюдавания фенотип.

Има редица публикации които описват транс действие на енхансерите пряко или чрез стимулиране на регулаторни фактори върху отдалечени гени локализирани в други хромозоми. По тази причина в рамките на изпълнението на тази задача не сме правили опит за категорично идентифициране на повлияните гени.

Идентифицирането на повлияните гени беше извършено с използване на методите на транскриптомиката.

#### 9. Полуколичествен RT-PCR и количествен real-time PCR.

За да потвърдим, че активационните Т-ДНК конструкти повлияват експресията на представените в таблица 1 гени използвахме първоначално полуколичествен RT-PCR.

Семената бяха отглеждани в стерилни петриеви блюда върху ½ MS agar без захароза в продължение на 4 седмици в климатична камера (температура 20 – 22<sup>0</sup> C, режим 14 ч светлина/10 ч тъмнина) (фиг. 23).

За изолиране на тотална РНК използвахме 50 милиграмови проби от всяка линия, които обработвахме с кит на RNeasy plant mini кит на Qiagen. Изолирането следваше приложения към кита протокол заедно с добавката за ДНК-азно третиране на колонките. РНК се съхранява в стерилна микроцентрофужна епруветка при температура – 80° С. За контрол на качеството на изолирането РНК 5 µl от елуата бяха нанасяни на агарозен гел и разделяни посредством електрофореза (фиг. 16).



Фиг. 16. Отглеждане на растения Arabidopsis върхи 1/2 MS агар в стерилни условия

Изготвени бяха по една двойка прави и обратни праймери за всеки от посочените в табл. 1 гени, така, че 3' краищата на правия праймер да включват интрон. По този начин праймерите работят само с РНК, а ако в пробата има остатъчна ДНК, тя не може да служи като матрица. 20 µg на изолираните общи РНКи се смесват с 1 µl от всеки прав и обратен ген- специфичен праймери (6 mmol.L-1 концентрация) в 200 мкл епруветки РСК след което проведохме RT-PCR реакция с Qiagen OneStep RT-PCR кит. Нивата на експресия са сравнени с тези на перманентно активния ген, кодиращ елонгационен фактор 1-алфа (EF 1 - At1g07940) (Сho и др., 1995) (Фиг. 16).

конструкта е възможно част от растенията да имат конструкти разположени на приблизитално едно и също място.



Фиг. 16. Сравнителен RT-PCR на линии експресиращи гена At5g05690. За сравнение е представена експресията на eEF1 α. За доказване на чистотата на PHK е пуснат сравнителен PCR с ДНК като матрица на гена At5g05690. Разликата в размера на продуктите показва, че пробите са свободни от ДНК.

#### **10. Differential display**

Differential display реакциите се провеждах според метода описан от Liang и Pardee (1992). Обща РНК (3 µг) се подлага на обратна транскрипция в краен обем от 25 µl с помощта на Superscript II обратна транскриптаза ( Life Technologies ) и 4 различни закотвени праймери олиго (oligo dT11) MN (MN = AG, AC, CC или GC) следвайки протокола на фирмата доставчик. Реакциите бяха разредени (1:60) и 1 µl аликвотни части се използваха като матрица за PCR. Differential display PCRa се провежда в 25 µl обем, съдържащ същия олиго (dT11) MN праймер и един от дегенеративните праймери (AP1: 5'- CAGGCCCTTC ; AP2 : 5' - TGCCGAGCTG ; AP3 : 5'- AGTCAGCCAC ; AP4 5'-AATCGGGCTG ; AP5 : 5'- AGGGGTCTTG ; AP6 : 5'- GGTCCCTGAC ; AP7 : 5'-GAAACGGGTG ; . или AP8 5'- GTGACGTAGG ) След първоначалното денатуриране в продължение на 4 минути при 94° С, следват 30 цикъла на амплифициране при следните условия: 30 сек при 94° С, 2 минути при 40 ° С и 45 сек при 72° С, последвани от допълнителен период удължаване на продуктите в продължение на 5 минути при 72° С. PCR продуктите се разделят чрез електрофореза в 7% денатуриращ полиакриламиден гел Фиг. 17. След електрофорезата гелът се промива с вода (ddH<sub>2</sub>O) и продуктите са визуализирани чрез оцветяване със сребро, съгласно Sanguinetti и съавтори (Sanguinetti и др., 1994). Differential display е провеждан в пет независими повторения, както е предложено от Stein и Liang (2002) намаляване на броя на грешните положителни резултати, дължащи се на обратната транскрипция и PCR артефакти



Фиг 17. Разделяне на полиакриламиден гел с продуктите от проведените реакции за differential display

Ивиците, които се експресират в различна степен от тези в дивия тип са изрязани от геловете със стерилен скалпел, клонирани в pDrive вектор и секвенирани. То този начин постъпихме и с ивици, които се експресират в дивия тип, а не се наблюдават в някой от мутантите. С тази комбинирана стратегия успяхме да идентифицираме както гените, които имат както повишена експресия, така и тези които не се експресират поради прекъсване на кодиращата им секвенция от Т-ДНК инсърта.

#### 11. Real-time PCR

За да направим по-точна количествена оценка на нивата на експресия проведохме също така и realtime PCR. Той се препоръчва от редица автори да се съчетава с differential display.

Количествения real-time PCR (qRT-PCR) анализът се извършва като използвахме qRT-PCR апарат на Вiorad в лабораторията на проф. Westwood. Праймерите за qRT-PCR бяха подбрани така, че правите праймери да включват в 3' края си екзон-интронна връзка. По този начин отстранихме ефекта от всякакви замърсявания с геномна ДНК. Всички реакции съдържа 10  $\mu$ l на SYBR Green магистър Mix, 25 нанограма сДНК, и 200 nM от всеки ген - специфичен праймер като реакциите бяха доведени до краен обем 20  $\mu$ l. qRT-PCR беше провеждан ползвайки следната програма: 50° C в продължение на 2 минути, 95° C в продължение на 10 минути, последвано от 40 цикъла на 95° C за 15 секунди и 60° C за 1 минута.

Резултат са представени в таблица 6. В таблицата със зелено са посочени имената на гените в повишена експресия в мутанта, а с червено тези с понижена или липсваща експресия.

# Списък на идентифицираните повлияни гени в устойчивите на опаразитяване активационни линии.

Линия	Повлияни гени	Функция
1	At5g23970	Цитоплазмено локализирана HXXXD-тип ацил трансфераза. Не е
		известно с какви биологични процеси участва
2	At4g21980	Генът колира APG8 – тип протеаза, която участва в процесите на
		автолеструкция при инфекции, формиране на проволящи тъкани и др.
	At4g21990	Генът колира ензим с adenvlyl-sulfate reductase activity. Място на
		активност - хлоропласти
	At4g22000	Генът колира белтък с неизвестна функция Установен е да се активира
		при процеси като клетъчна смърт и старее.
3	At5g11080	Убиквитин синтаза Неизвестна функция
-	At5g11070	Генът колира потенциален рецепторен белтък реагираш на
	110 811070	брасиностероили
4	At3g22180	DHHC-тип Zn-свързващ транспортен белтък. Palmitovl transferase –
-		локализирана в цитоплазмената мембрана
	At3g22183	Генът колира белтък с неизвестна функция, локализиран с
		ендоплазматичната мембрана
	At3g22190	Генът колира калмодулин свързваш белтък, локализиран с ядрото.
		Функцията му е неизвестна
5	At3g18440	Алуминий зависим малатен транспортер. Транспорт на малат в
-		проводящата тъкан
	At3g18450	Продукта на гена принадлежи към PLAC8 тип белтъци. Съдържа
		Interpro домеин, богат на цистеин. Неизяснени функции
6	At5g47090	Кодира протеин с неизяснени функции DUF2052,
	At5g47100	ATCBL9 – белтък отговорен за калний - мелиираната сигнализания при
	1.108.0100	волен лефицит
7	At1g64065	Генът колира "Late embryogenesis abundant (LEA) белтък". Вероятно
		регулаторен фактор участваш в ембриогенезата и клетъчната
		пролиферация
	At1g64070	Продуктът на този ген участва в сигналната трансдукция отговорна за
		защитни реакции срещу патогени
8	At1g64065	Генът кодира "Late embryogenesis abundant (LEA) белтък". Вероятно
		регулаторен фактор участващ в ембриогенезата и клетъчната
		пролиферация
	At1g64070	Продуктът на този ген участва в сигналната трансдукция отговорна за
		защитни реакции срещу патогени
9	At1g64065	Генът кодира "Late embryogenesis abundant (LEA) белтък". Вероятно
		регулаторен фактор участващ в ембриогенезата и клетъчната
		пролиферация
	At1g64070	Продуктът на този ген участва в сигналната трансдукция отговорна за
		защитни реакции срещу патогени
10	At1g64065	Генът кодира "Late embryogenesis abundant (LEA) белтък". Вероятно
		регулаторен фактор участващ в ембриогенезата и клетъчната
		пролиферация
	At1g64070	Продуктът на този ген участва в сигналната трансдукция отговорна за
		защитни реакции срещу патогени
11	At3g29110	Ядрено кодирана, хлоропластно базирана терпеноид циклаза. Участва в
		хлоропластния биосинтетичен път на терпеноидите
12	At5g05690	Кодира член на семейството СР90А, на цитохром Р450 моно
		оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone

		в края на пътя C6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на
		пътя C6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
13	At5g05690	Кодира член на семейството СР90А, на цитохром Р450 моно
		оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone
		в края на пътя C6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на
		пътя C6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
14	At5g05690	Кодира член на семейството СР90А, на цитохром Р450 моно
		оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone
		в края на пътя C6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на
		пътя C6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
15	At5g05690	Кодира член на семейството СР90А, на цитохром Р450 моно
		оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone
		в края на пътя C6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на
		пътя Сб окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
16	At5g05690	Кодира член на семейството СР90А, на цитохром Р450 моно
		оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone
		в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на
17	A. 4. 20080	пътя С6 окислението при огаззіпопа-ната ойосинтеза.
1/	At4g30080	Auxin Response Factor 16 – регулира формирането на кореновата гугла и
	$1 \pm 4 \approx 20074$	Клетъчната диференциация
	At4g50074	кодира член на групата на малките, цистеин обгата протеин
10	<u>At4~20080</u>	$\Delta_{\rm UV}$ in Paspanese Factor 16 percuruma domumatiana da konsulazio d
10	A14g30080	Кихии Кезронзе гастог то – регулира формирането на кореновата гугла и
	$\frac{4t}{3}0074$	Котира илен на групата на малките, пистеми богата протеми
	<u>Al+25007+</u>	секретирани от корена
19	At4g30080	Auxin Response Factor $16 - pervutupa dopmupatero ha kopehobara ryrua u$
17		клетъчната лиференциация
	At4g30074	Кодира член на групата на малките, цистеин богата протеин
		секретирани от корена
20	At4g30080	Auxin Response Factor 16 – регулира формирането на кореновата гугла и
		клетъчната диференциация
	At4g30074	Кодира член на групата на малките, цистеин богата протеин
		секретирани от корена
21	At4g30080	Auxin Response Factor 16 – регулира формирането на кореновата гугла и
		клетъчната диференциация
	At4g30074	Кодира член на групата на малките, цистеин богата протеин
		секретирани от корена
22	At4g30080	Auxin Response Factor 16 – регулира формирането на кореновата гугла и
	A.A. 2007A	клетъчната диференциация
	At4g30074	Кодира член на групата на малките, цистеин богата протеин
22	<u> </u>	Секретирани от корена
23	A(2g)2270	цинков транспортер 5. Експресира се в корените при дефицит на цинк
24	At5g23960	(_)-F-beta-carvonhyllene synthase Vстановена е повишена активнист в
24	110520700	отговор на атака от растителноялни насекоми и фитопатогени. Участва
		в биосинтетичния път на сесквитерпените
25	At1g18100	Фосфатилилетаноламин - свързваш протеин. Експресира се преди
		всичко в преходната зана корен-хипокотил. Има АБК - чувствителна
		експресия
26	At5g23960	(-)-E-beta-caryophyllene synthase, Установена е повишена активност в
		отговор на атака от растителноядни насекоми и фитопатогени. Участва
		в биотинтетичния път на сесквитерпените
27	At2g45580	Цитохром Р450, от група 76С3. Има екстрацелуларна локализация
28	At2g45580	Цитохром Р450, от група 76С3. Има екстрацелуларна локализация

29	At2g45580	Цитохром Р450, от група 76С3. Има екстрацелуларна локализация
30	At5g23960	(-)-E-beta-caryophyllene synthase, Установена е повишена активност в
		отговор на атака от растителноядни насекоми и фитопатогени. Участва
		в биотинтетичния път на сесквитерпените
31	At5g26749	Zn-свързващ регулаторен фактор. Регулира генната експресия.
		Повлияни гени - неизвестни
32	At1g18100	Фосфатидилетаноламин - свързващ протеин. Експресира се преди
		всички в преходната зона корен-хипокотил. Има АБК - чувствителна
		експресия

Анализът на получените резултати за експресията на повлияните гени откроява няколко интересни групи гени:

А) При линиите при които е променена продукцията на стимуланти на прорастване имаме тройно попадение (L24, 26 и 30) свързано с активиране на ядрено кодираната, хлоропластно локализирана E-beta-caryophyllene синтаза. Известно е, че хлоропластния биосинтетичен път на терпеноидите е източник на стимулантите на прорастване, които по химична структура са сесквитерпен лактони. Активирания ген участва в биотинтетичния път на сесквитерпените. Освен това е доказано, че се активира в отговор на атака от растителноядни насекоми и фитопатогени. Всичко това ни дава основание да считаме, че сме открили ген пряко свързан с биосинтезата на СП. Втори също толкова обещаващ ген е идентифициран с линия 11 - ядрено кодирана, хлоропластно базирана терпеноид циклаза, която също участва в хлоропластния биосинтетичен път на терпеноидите. За да проверим дали наистина има промяна с биосинтезата на терпеноиди кореновите излъчвания и ензимни екстракти от генотипите бяха изследвани в центъра по Метаболомика към Медицинския университет на Южна Каролина, САЩ.

Наличието на повишено количество стиголатони е доказано и чрез HPLC-MS (Фиг. 18).



## Фиг. 18. HPLC-MS анализ за присъствието на повишени количества СП

**Б)** *Сред линиите, които проявяват устойчивост без промяна в продукцията на СП* се открояват няколко в които имаме множествени попадения в определен ген:

- при пет от линиите с повишена устойчивост е активиран генът кодиращ на цитохром P450 монооксигеназа. Това е един от ензимите (CP90A), които брасиностероидната биосинтеза. Брасиностероидите (BR) са известни като шести клас на растителни хормони. Техния биосинтетичен път започва от кампестерол, като вероятно всички тъкани и органи на растенията произвеждат BR. Те изпълняват ролята на сигнални молекули регулиращи процеси свързани с клетъчната диференциация и защита от стрес.

Предполагаме, че активирания ген повишава устойчивостта на арабидопсис срещу синя китка като влияе върху процесът на формиране на хаусториална връзка. Кореновите паразити формират хаустории – зони в които проводящите системи на паразита и гостоприемника се сливат. Така паразита може да си доставя, хранителни вещества от проводящата система на гостоприемника.

- за брасиностероидите е известно че влияят на диференциацията на проводящата тъкан; ускоряват процесите на стареене и клетъчна смърт; играят роля при защита на растенията по време на стрес. Вероятно повишената експресия на СР90А променя баланса на брасиностероидите и с това помага на растението – гостоприемник да блокира инвазията на паразита. Възможно е това да става като се постиска диференциацията на проводящите тъкани на паразита и респективно проникването им в проводящата система на гостоприемника. Алтернативно е възможно да се засилва реакцията на свръхчувствителност и програмирана клетъчна смърт на мястото на инвазията на паразита с което инвазивните му клетки биват изолирани. Независимо от конкретния механизъм, крайния отговор, който наблюдаваме не невъзприемчивост на гостоприемника към опаразитяване.

- за отбелязване е, че брасиностероидите влияят на процесите на кореново развитие и диференциация заедно с ауксините. Затова не е изненада, че при други 6 мутантни линии се наблюдава блокиране на експресията на ген отговорен за ауксинов рецептор в корените. Auxin Response Factor 16 регулира формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация. Мутанти в които този ген не се експресира са невъзприемчиви към опаразитяване. Както и при предишната група считаме, че липсата на този фактор пречи на формирането на хаусториална връзка. Сравняването на получените резултати показа че при повечето от устойчивите мутантни линии нямат промяна в количеството стимуланти на прорастването. Вероятно устойчивоста там се дължи на други механизми касаещи по-късните етапи на взаимодействие на паразита с гостоприемника.

Изследванията ни позволиха да открием 7 линии при които има статистически достоверни изменения в количеството отделяни стимуланти на прорастването.

## Изводи

- 1. Извършено е скриниране на 62 000 активационни мутанти на Арабидопсис и са установени 32 единични локации на Т-ДНК инсърти, които повлияват възприемчивостта на гостоприемника към синята китка.
- 2. Биохимичния и експресионен анализ показва, че в седем линии има промяна в експресията и продукция на стимуланти на прорастване.
- 3. При три от линиие то е свързано с активиране на ядрено кодираната, хлоропластно локализирана E-beta-caryophyllene синтаза участваща в биотинтетичния път на изопреноидите.
- 4. Идентифицирани са и активационни мутанти на ядрено кодирана, хлоропластно базирана терпеноид циклаза, която също участва в хлоропластния биосинтетичен път на терпеноидите. Наличието на повишено количество стиголатони е доказано и чрез HPLC-MS
- Сред линиите, които проявяват устойчивост без промяна в продукцията на СП се открояват четири, при които е активиран генът, кодиращ цитохром Р450 монооксигеназа. Това е един от ензимите на брасиностероидната биосинтеза – ензим активиращ се при процеси свързани с клетъчната диференциация и защита от стрес.
- 6. В други от линиите Т-ДНК е в секвенцията на Auxin Response Factor 16, който регулира формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация. Мутанти в които този ген не се експресира са невъзприемчиви към опаразитяване.

#### Цитирана литература

Clermont K., Wang Y., Liu S., Yang Z., dePamphilis C.W, Yoder J., Collakova E., Westwood J.H., 2019 Comparative Metabolomics of Early Development of the Parasitic Plants Phelipanche aegyptiaca and Triphysaria versicolor, Metabolites, 9, 114, 1-19.

Gevezova M.. Dekalska T., Stoyanov K., Hristeva T., Kostov K., Batchvarova R., Denev I., 2012, Recent advances in Broomrapes research, J. BioSci. Biotech. 1 (2) 91-105.

Joel D.M. 2000. The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite – Crop Protection, 19 (8-10) 753-758

Musselman L. 1994. Taxonomy and spread of Orobanche. – In: Pieterse, AH, Verkleij J A C, Ter-Borg SJ. (eds.), Biology and Management of Orobanche. Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and related Striga research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, p. 27-35.Joel, 2000

Samejima H, Sugimoto Y. Recent research progress in combatting root parasitic weeds. Biotechnol Biotechnol Equip. 2018;32:221–240.Musselman, 1980

Tchalakov Ch., Bozoukov Ch., Georgieva I., 1991, Progress in Orobanche Research – Proceedings of the international workshop on Orobanche Research, Obermarchtal, 1989, pp. 234-238

Wegmann, K., 1998. The *Orobanche* problem in tobacco, in: Wegmann, K., Musselman, L.J., Joel, D.M. (Eds.), Proceedings of the 4th International *Orobanche* Workshop Albena, Bulgaria, 23–26 September, 1998, Institute for Wheat and Sunflower, General Toshevo, Bulgaria, pp. 21–24Slavov et al., 2001

Westwood, J. H. 2001. Parasitic plant research in the era of genomics: in Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium, Pp82–87.

Nantes, France University of Nantes.Westwood JH, dePamphilis CW, Das M, Fernandez-Aparicio M, Honaas LA, Timko MP, Wafula EK, Wickett NJ, Yoder JI. 2012. The Parasitic Plant Genome Project: New tools for understanding the biology of Orobanche and Striga. Weed Sci., 60: 295–306.

#### Публикации свързани с дисертацията

- 1. **Ina Kirilova**, Iliya D. Denev, Rumyana Bineva, Maria Gevezova, Milena Alexandrova, Kaloyan Kostov, Rossitza Batchvarova, (2014): Identification of activation-tag Arabidopsis mutants with altered production of germination stimulants for Phelipanche ramosa (L.), Biotechnology & Biotechnological Eq., 28 (2), 199-207. (IF 0,3)
- 2. Ina Kirilova, Tsveta Hristeva & Iliya Denev (2019): Identification of seeds of *Phelipanche ramosa*, *Phelipanche mutelii* and *Orobanche cumana* in the soils from different agricultural regions in Bulgaria by molecular markers, Biotechnology & Biotechnological Equipment, DOI: 10.1080/13102818.2019.1591933 (IF 1,227).

#### Приноси

- 1. Доказано е с молекулярни маркери, че сред събраните образци няма български представители на вида *P. mutelli* сходни с тези обитаващи останалите европейски държави (потвърдителен принос).
- 2. Доказано е, че в генома на *Arabidopsis thaliana* L. присъстват гени които могат да осигурят устойчивост срещу *P. ramosa* (оригинален принос)
- 3. Установени са два ядрено кодирани гена (E-beta-caryophyllene синтаза и терпеноид циклаза), чиито продукти са локализирани в хлоропластите и активирането им води до повишаване устойчивостта на Arabidopsis към опаразитяване със *P. ramosa* (оригинален принос).
- 4. Установено е, че активирането на цитохром Р450 монооксигеназа ензим активиращ се при процеси свързани с клетъчната диференциация и защита от стрес също води до повишаване устойчивостта на Arabidopsis към опаразитяване със *P. ramosa* (оригинален принос).
- 5. Установено е, че блокирането на Auxin Response Factor 16, който регулира формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация прави Arabidopsis невъзприемчив към опаразитяване (оригинален принос).
- 6. Разработена е нов комплект от праймери за идентифициране местата на инсърция на pSKI015 в геномът на Arabidopsis и за Southern blot (Методически принос)
- 7. Гени, повишаващи устойчивостта срещу опаразитяване могат да бъдат търсени и повлияни в генома на ценни селскостопански култури (научноприложен принос)