



**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)**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
на  
**ДИ С Е Р Т А Ц И Я**

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 интересувашите 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

**ДИ С Е Р Т А Ц И Я**

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. д-р Росица Бъчварова – рецензент**

**Проф. д-р Иван Атанасов - рецензент**

**Проф. д-р Нася Томлекова**

**Проф. д-р Илия Денев**

ПЛОВДИВ  
2019

# Д Е К Л А Р А Ц И Я

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.

Д Е К Л А Р А Т О Р:

**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

PME - пектин метил естераза

qRT-PCR – количествен real-time PCR

ТАЕ – триацетатен 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 селектиране 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 рSKI015.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Цел:** Да се направи молекулярно-генетичен анализ на мутантни генотипове *Arabidopsis thaliana*, съдържащи pSKI015 T-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 T-ДНК инсъртите в устойчивите 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 DNAeasy 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 жизнестойност

Тестът се провежда по метода на Maugomiale et al. (2005), използвайки TTC (2,3,5-трифенилтетразол хлорид).

#### 2.5. Тестове за покълване

Тестовите за кълняемост са проведени по метода Magnus et al (1992).

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

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

Използвани са нуклеотидните секвенции на региона кодиращ 18S – ITS1-5,6S – ITS2-26S рибозомна РНК при изследваните видове, анотирани в NCBI. Първоначално направен алаймънт (алгоритъм Clustal W) на секвенциите посредством VectorNTI 10.1 за да се анализира вариабилността в анотираниите секвенции. Получената консенсусна секвенция е използвана за изготвяне на дегенеративни праймери посредством on-line програмата PRIMER 3 Plus. Праймерите бяха поръчани и доставени от германската фирма Metabion.

**2.6.2. PCR реакциите за изолиране на ITS1/2 региона** са провеждани в реакционна смес съдържаща 2 µl матрична ДНК с концентрация ≈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 (Fermentas). Програмата на PCR реакциите беше: 94° C- 3 min; последвана от 35 цикъла 94° C- 45s; 55° C- 1.5 min; 72° C – 2.5 min и съхранение при 16° C -∞.

**2.6.3. PCR продуктите са разделени на 1,5% агарозен гел** 1X TAE буфер съдържащ 0,5 µl етидиев бромид. За да се проследи придвижването на PCR 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 PCR 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-11-dUTP (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 За 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 линии 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 Maximum likelihood и прилагане на молекулен часовник посредством софтуер MEGA 7.



## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

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

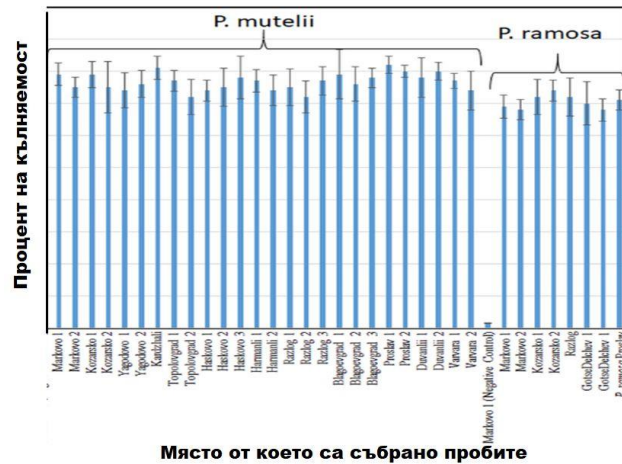
Таблица 1

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

№	Имена на видовете по морфология на семената.	Местоположение	Кратко име на пробата
1	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Марково 1	<i>P. mutelii</i> Markovo 1
2	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Марково 2	<i>P. mutelii</i> Markovo 2
3	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Козарско 1	<i>P. mutelii</i> Kozarsko 1
4	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Козарско 2	<i>P. mutelii</i> Kozarsko 2
5	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Ягодovo 1	<i>P. mutelii</i> Yagodovo 1
6	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Ягодovo 2	<i>P. mutelii</i> Yagodovo 2
7	<i>P. mutelii</i>	Доматена нива край Кърджали	<i>P. mutelii</i> Kardzhali
8	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Тополовград 1	<i>P. mutelii</i> Topolovgrad 1
9	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Тополовград 2	<i>P. mutelii</i> Topolovgrad 2
10	<i>P. mutelii</i>	Доматена нова край Хасково 1	<i>P. mutelii</i> Haskovo 1
11	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Хасково 2	<i>P. mutelii</i> Haskovo 2
12	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Хасково 3	<i>P. mutelii</i> Haskovo 3
13	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Харманли 1	<i>P. mutelii</i> Harmanli 1
14	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Харманли 2	<i>P. mutelii</i> Harmanli 2
15	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Разлог 1	<i>P. mutelii</i> Razlog 1
16	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Разлог 2	<i>P. mutelii</i> Razlog 2
17	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Разлог 3	<i>P. mutelii</i> Razlog 3
18	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Благоевград 1	<i>P. mutelii</i> Blagoevgrad 1
19	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Благоевград 2	<i>P. mutelii</i> Blagoevgrad 2
20	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Благоевград 3	<i>P. mutelii</i> Blagoevgrad 3
21	<i>P. mutelii</i>	Доматена нова край Прослав 1	<i>P. mutelii</i> Proslav 1
22	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Прослав 2	<i>P. mutelii</i> Proslav 2
23	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Дуванлии 1	<i>P. mutelii</i> Duvanlii 1
24	<i>P. muteliil</i>	Тютюнева нива край Дуванлии 2	<i>P. mutelii</i> Duvanlii 2
25	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Варвара 1	<i>P. mutelii</i> Varvara 1
26	<i>P. mutelii</i>	Тютюнева нива край Варвара 2	<i>P. mutelii</i> Varvara 2
27	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Марково 1	<i>P. ramosa</i> Markovo 1
28	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Марково 2	<i>P. ramosa</i> Markovo 2
29	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Козарско 1	<i>P. ramosa</i> Kozarsko 1
30	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Козарско 2	<i>P. ramosa</i> Kozarsko 2
31	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Разлог	<i>P. ramosa</i> Razlog
32	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Гоце Делчев 1	<i>P. ramosa</i> GotseDelchev 1
33	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Гоце Делчев 2	<i>P. ramosa</i> GotseDelchev 1
34	<i>P. ramosa</i>	Тютюнева нива край Прослав	<i>P. ramosa</i> Proslav

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

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. mutellii* след третиране с GR24.

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

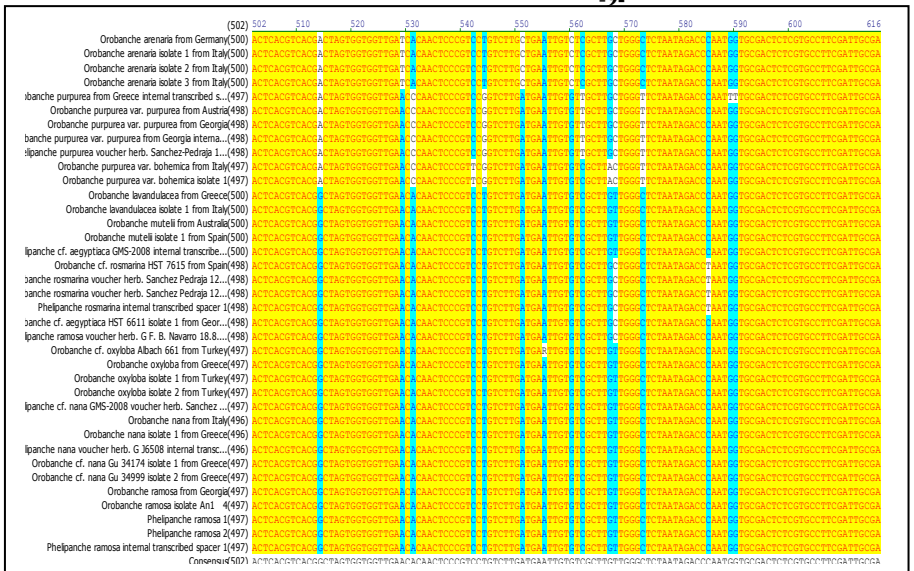
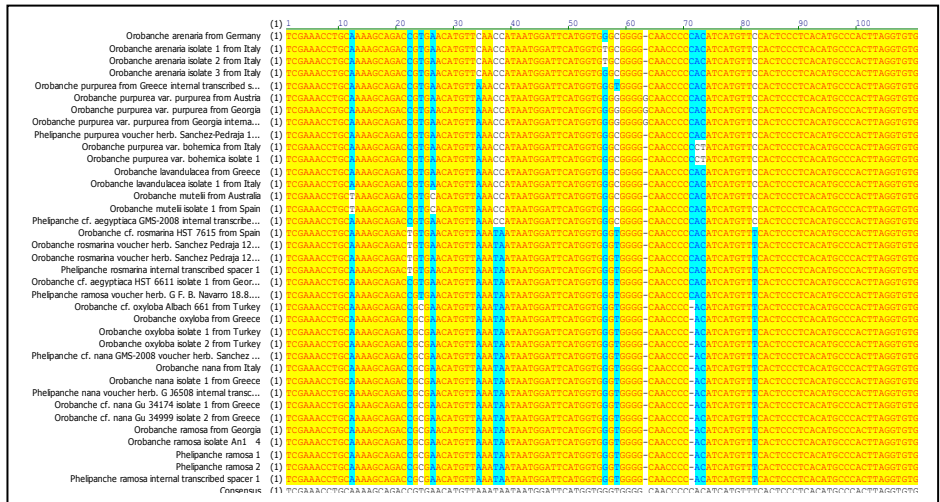
За да можем да определим по молекулярни маркери видовата принадлежност на събраните семена изолирахме ДНК от събраните проби.

Алайнмента на секвенциите е направен посредством програмата Vector NTI 11, както това е описано в М&М. Получената в резултат на алайнмента 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 рНК, а обратните праймери - на областта в близост до 5' края на 26S секвенцията. Праймерите са представени в таблица 2.

Таблица 2

Списък на праймерите използвани за изолиране на ITS1/2 региона

<i>Phelipanche ramosa/mutellii</i>		
Име на праймера	Секвенция 5'-3'	Tm
18S Fw1	5'- CTGTTTGATGAGCRTGCGTA-3'	56.6
18S Fw2	5'- GGTCAGVTA AAGGCTGACCA-3'	56.8
26 S Rev1	5'-TTTCTCCTTAGGCGCATMTCTC -3'	55,5
26 S Rev2	5'-GATTCAATCCAGCCACAGGT-3'	56.3



Фиг.2. Множествен алайнмент на секвенциите на гените кодиращи 18S и 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 посредством 1% агарозен гел.

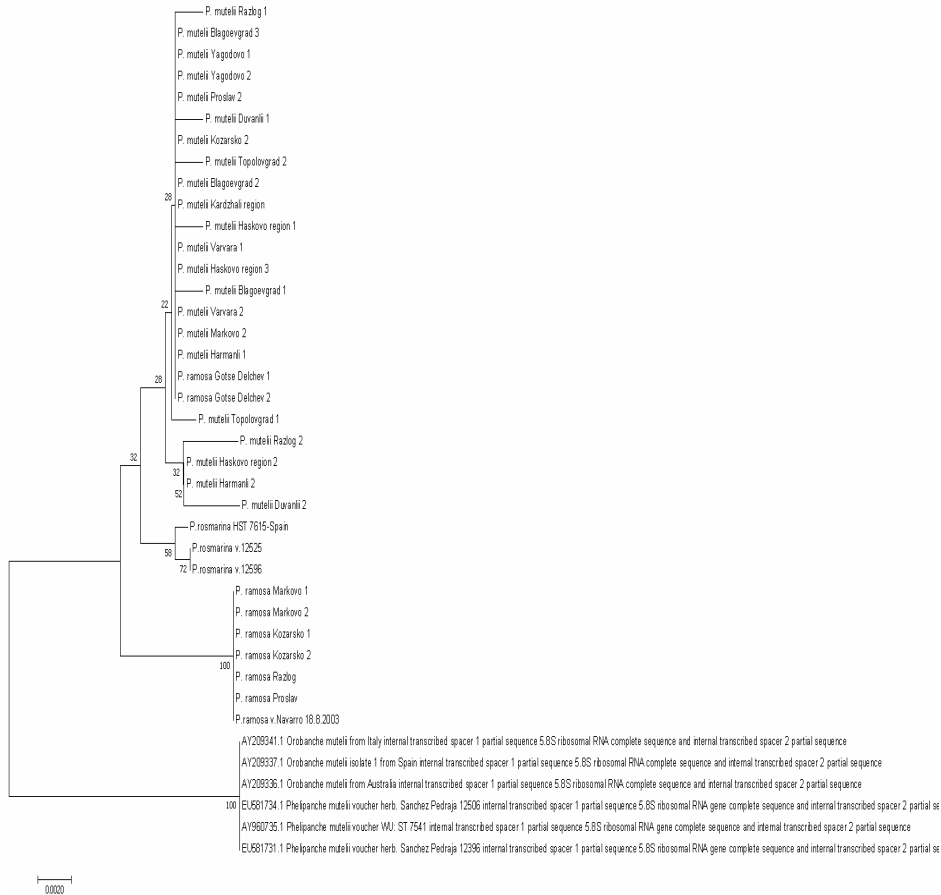
**2.2. Секвениране**

Получените в резултат на PCR реакцията продукти са изрязани от гела с чист скапел. 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 анотирани в NCBI.

Първоначално за да калибрираме параметрите на програмата използвахме анотирани в NCBI секвенции. Най-подходящ се оказа алгоритъма Maximum likelihood. 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 изследваната бяха използвани само семена, които със сигурност принадлежаха към *P. ramosa*.



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

### 3 Скриниране за устойчиви линии на активационни мутанти 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 активационни мутантни линии на *Arabidopsis* (CS 31000), която практически обхваща целия геном на растението.

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

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

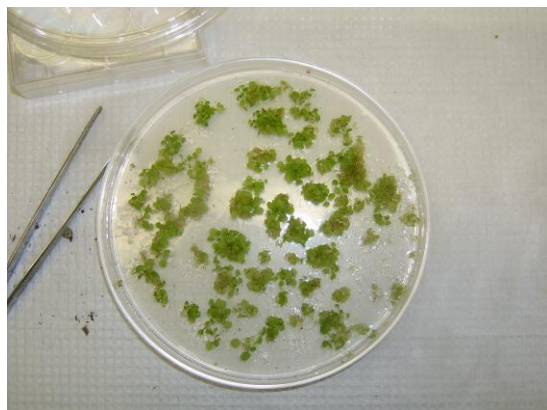
2. Реакциите на гостоприемника по време на инвазията на паразита и формирането на хаусториална връзка

#### 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 мутантни бяха необходими 1500 кв. м. площ. Тъй като на територията на АБИ и ПУ "П. Хилендарски" не разполагаме с толкова голяма площ. Наложихме 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 T3 поколение. Пуловете бяха разделени между ПУ и АБИ за да можем да проведем паралелно скринирането.



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

От всеки от пуловете бяха взети по 3100 семена ( $\approx 10$  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 отстраним 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 засадени в 15 см стерилни петриеви блюда съдържащи 0,8% MS агар. Блюдата първоначално бяха поставяни в хладилник при 4о 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 - 22о 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 поддръжане на семенна банка. При отчитане на резултатите освен показателите развитие и цъфтеж като селекционни маркер, след събиране на семената, проверявахме корените на опитните растения 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 представлява 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 разстояние до 5000 н.д. от мястото на вмъкване на конструкта е възможно част от растенията да имат конструкти разположени на приблизително 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 растения. 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 успеха 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, принадлежащи 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**

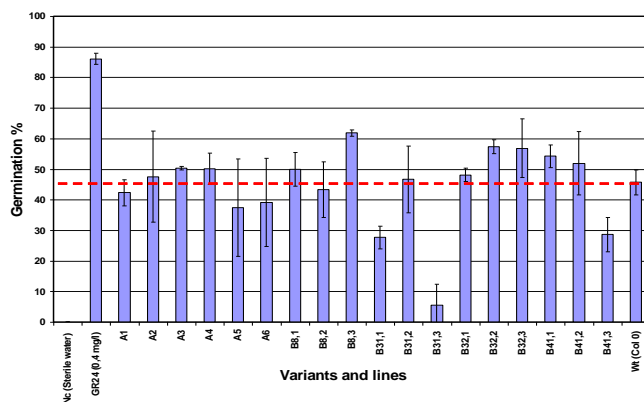
### **5.1. Отглеждане на *Arabidopsis*:**

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 стерилизиция 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 4о 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 - 25о 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 експриметите. Тъй като количеството на СП е изключително 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 разтвор на натриев хипохлорид а 0,2% Tween 20. Семената се измиват с стерилна дестилирана вода, разпределят се равномерно върху стерилни 1 cm дискове от стъклена филтърна хартия и всеки един диск се покрива с подобен (Magnus et al. 1992, Denev et al., 2007a, b). Така изготвените "сандвичи" се навляжнвяват със стерилна дестилирана вода и се инкубират на тъмно при 26°С за 14 дни (Magnus 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 *P. ramosa* третирани с коренови излъчвания, 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 плазмидата посредством която са създадени активационните линии pSK1015. Известно е, че при трансформацията в генома на всяка една активационна линия се интегрира фрагмент от плазмидата 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 до 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
      AAGTCCACC GGGTCAAAGCGGCAGCGGCGGCAGGATAT ATT=Left Border CAATTGT AAATGGCTTC
      ATGTCCGGGA AATCTACATG GATCAGCAAT GAGTATGATG GTCAATATGG AGGAAAAGAA AGAGTAATTA
7801   CCAA = LB4 TTTTTT TTCAATTCAA AAATGTAGAT GTCCGACGCG TTATTATAAA ATGAAAGTAC
      ATTTTGATAA AACGACAAAT TACGATCCGT CGTATTTATA
7901   GCGGAAAGC = LB3 A ATAACAAAT 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 броя на Т-ДНК инсъртите Southern blot

Преди да пристъпим към ТАИЛ-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 рSKI015. 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 конструктор на Weigel и сътр. вмъкнат в вектора рSKI015 (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 рSKI015

CGCGCAGCGGGCGGAGGATATTC AATTGTA AATGGCTTCATGTCCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGGAAA  
AGAAAAGAGTAATACCAATTTTTTTTCAATTCAAAAATGTAGATGTCCGCAGCGTATTATAAAAATGAAAGTACATTTTGATAAAACGACAAAATTACG  
ATCCGTCGATTTATAGGCGAAAGCAATAAAASAAATTATTCTAATTCGGAAATCTTTATTTTCGACGTGTCTACATTCACGTCCAAATGGGGGCTTAGA  
TGAGAAATTCACGATCGATATCTAGATCTCGAGCTCGAGATCTAGATATCGATAAGCTTGCATGCCTGCA GGTCTGTGTAGCCTCGACATGTTGTC  
GCAAAATTCGCCCTGGACCCGCCAACGATTTGTCTGCTACTGTCAAGGTTTACCTGCATTCATTTGGGGCCACATACACCAAAAAAATGCTGCAT  
AATTCTCGGGGCAGCAAGTCGGTTACCCGGCCGCCGTGCTGGACCGGGTTGAATGGTGCCGTAACCTTCGGTAGAGCGGACGGCCAAATACTCAACT  
TCAAGGAATCTCACCCATGCGCGCCCGCGGGAACCGGAGTCCCTTCAGTGAACGTATTAGTTCGCGCGCTCGGTGTGTCTGATAGTAGCCCTG  
GGGCTTTTGA AATTTGAATAAGATTTATGTAATCAGTCTTTTAGGTTTACCGGTTCTGCGCTTTTTTAA AATTTGGATTTGTAATAATAAAACGCA  
ATTGTTTGTATTGTGGCGCTCTATCATAGATGTCTGCTATAAACCTATTCAGCACAATATATTGTTTTCATTTAATATTGTACATATAAGTAGTAGGGT  
ACAATCAGTAAATTGAA

Праймер BAR-Fw1

CGGAGAAATATTATTCATAAAAATACGATAGTAACGGGTGAT ATATTCATTAGAATGAACCGAAAC CGCGGTAAGGATCTGAGCTACACATGCTCAG  
GTT

Праймер BAR-Fw2

TTTTACAACGT GCACAACAGAATTGAAAGCAAATA T CATGCGATCATAGCCGCTCTCGCATATCTCATTAAGCAGGACTCTAGGA  
TCGATCCCCCGGGTATCASCATCTCGGTGACGGGCAGGACCGGACGGGGCGGTACCGGCAGGCTGAAATCCAGCTGCCAGAAAC  
CCACGTCATGCCAGTTCCCGTGTGTAAGCCGGCCGCCCGCAGCATGCCCGGGGGGCATATCCGAGCGCCTCGTGCATGCCAC  
GCTCGGGTCTGTTGGGAGCCCGATGACAGCGACACGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGGACTTCAGCAGGTGGGTGTAGAGC  
GTGGAGCCAGTCCCGTCCGCTGGTGGCGGGGGAGACGTACACGGTTGACTCGGCCGTCCAGTCGTAGGCGTTGCGTGCCTTCC  
AGGGGCCCCGCTAGGCGATGCCGGCGACCTCGCGTCCACCTCGGGCAGCAGCCAGGATAGCGCTCCCGCAGACGGACGAGGT  
CGTCCGTCCTCTGCGGTTCTGCGGCTCGGTACGGAAGTTGACCGTGTCTCTCGATGTAGTGGTTGACGATGGTGCAGACC  
GCCGGTACAGGCGGAGCCACCGTCCGCTACAGCCGGCCCGCAGCAAGACC CGAGTACCATTAAACATTTATCAT AACATTAC  
AACAACAACAACAACAACA

Праймер BAR-Rev2

CCATTAACAACATTTTATCTCGAGAA TATGAGTCTCTTAAGCGATCTCAG C TAAACCACATAGCTCTA

Праймер BAR-Rev1

ACCAATCTTTAAGTCTACGATCASCATTCASAATTTGGGAAGATATAATAGGAAGCAAGGCTATTTATCCATTTCTGAAA  
AGGCGAAATGGCGTACCGCGAGCGTACCGCGCATTCGTTCTTG

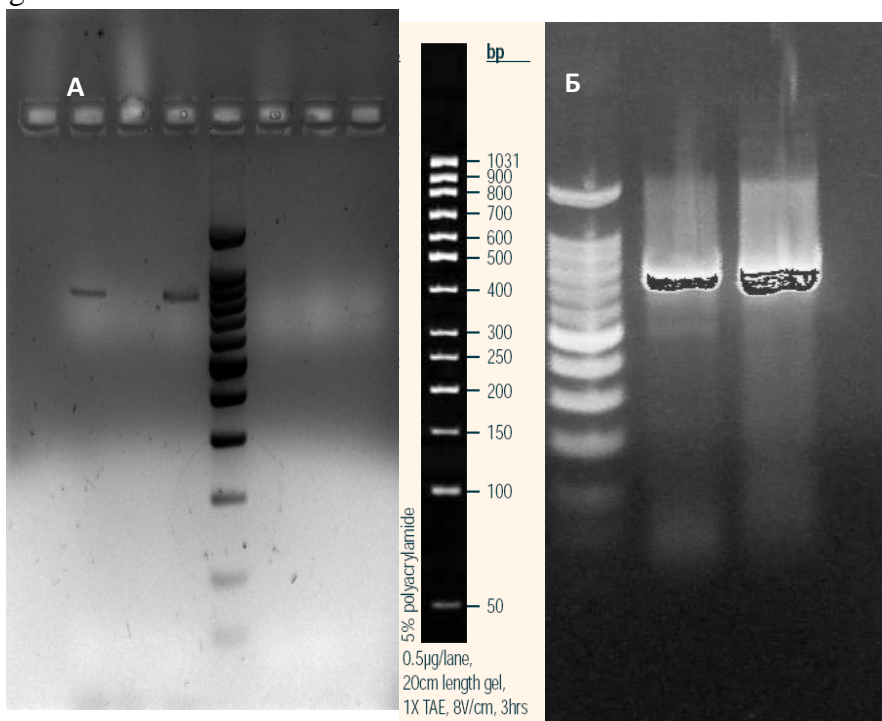
Фиг. 10. Фрагменти от Т-ДНК на инсърта от конструктора рSKI015 с означени позиции на праймерите

## 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).

PCR 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 показваха, 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 kit на фирмата Qiagen.



Фиг. 11. Електрофореза (в 1 % агарозен гел) на PCR продуктите от амплификация на BAR гена (А) и на хибридационната 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 пречистваан 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 kit (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 µl от продуктите на опитната и контролната PCR реакции бяха разредени с 5 µl 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.

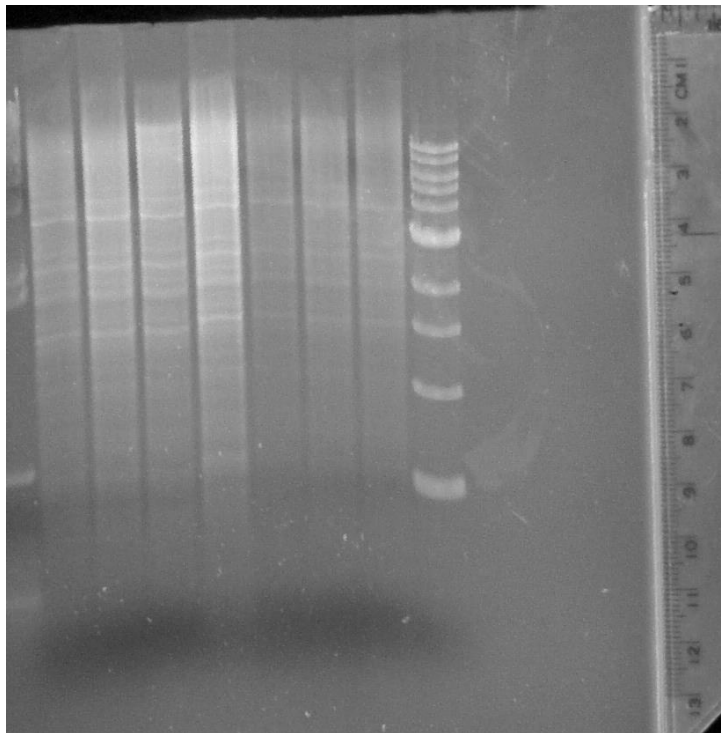


Фиг. 12. Електрофоретично разделяне на 1 % агарозен гел на белязаната с Dig-11-dUTP хибридизационна проба съпоставена с контролата

#### 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°C (по указание на фирмата производител).

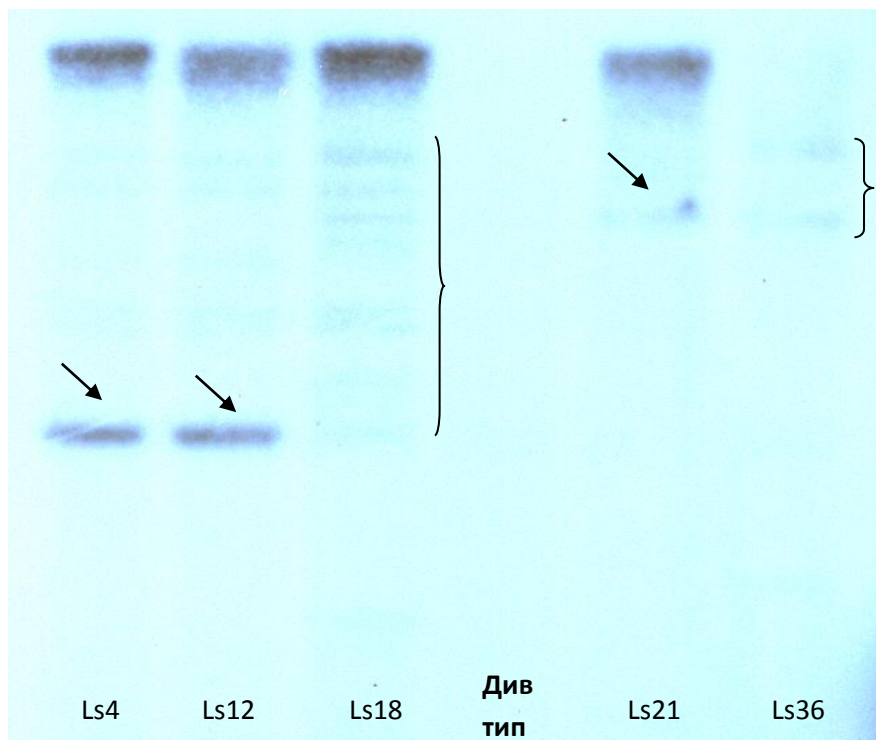
ДНК фрагментите бяха разделени електрофоретично на 1% агарозен гел в 1x TAE (3.75mM Tris, 1M EDTA, 2mM натриев ацетат) за една нощ при напрежение 20-25 V (Фиг. 20).



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 VAR гена и респ. на T-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.



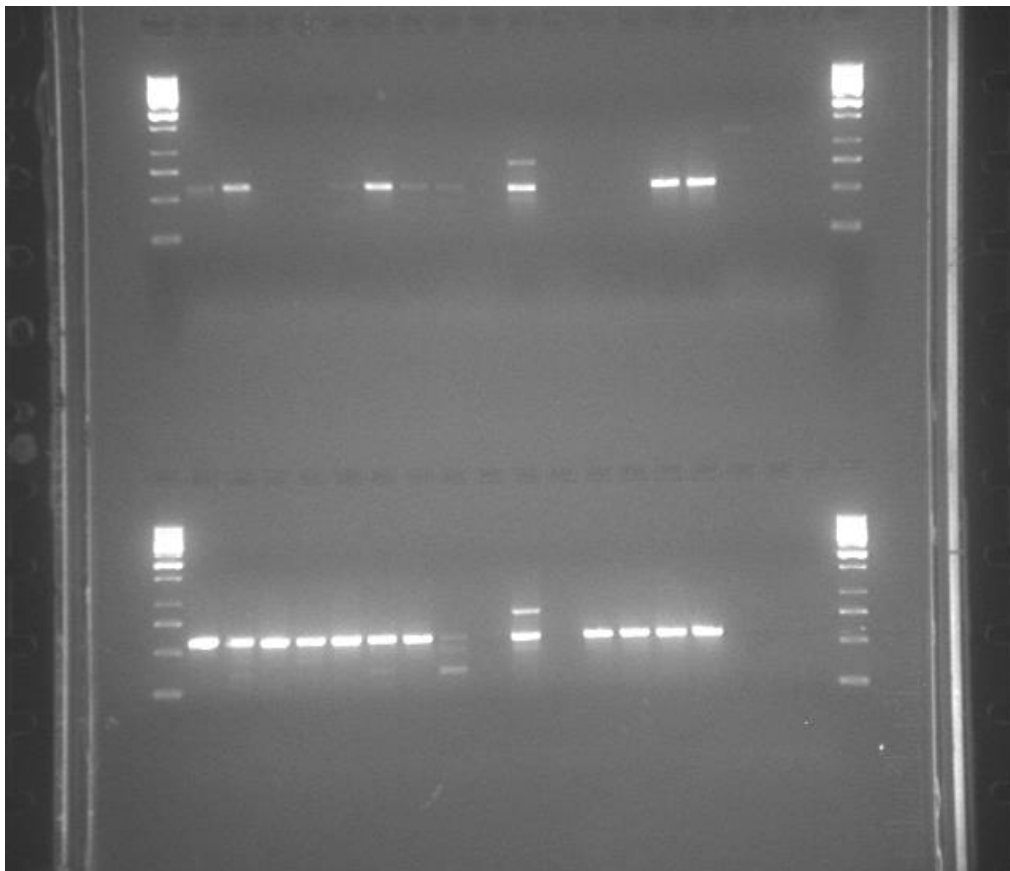
Фиг. 14. Southern blot с геномна ДНК изолирана от устойчиви към опаразитяване линии *Arabidopsis*

## 8. Провеждане на TAIL-PCR реакциите

Геномна ДНК от всички 32 индивидуални линии е използвана за провеждане на TAIL-PCR реакциите. Условиата 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 гелове бяха прехвърляни на отделен транслюминатор 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 QIaquick 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-те 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.



Таблица 3

Списък на идентифицираните места на интеграция на активационния Т-ДНК инсерт.  
 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

Генотип тестван в България	Генотип тестван в USA	Номенклатурен код на генния участък (по NCBI)	Хромозома/ Позиция
35-3	26_A7	AL161576	Хромозома 5 8093325
35-4	26_H6	AL161576	Хромозома 5 8093329
35-5	22_D4	AL161576	Хромозома 5 8093341
36-6	22_E3	AL162971	Хромозома 5 9399653
37-5	22_D3	AC005727	Хромозома 5 19128001 (knock-out)
38-6	22_F3	AC003680	Хромозома 3 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 1707856
85-5	22_H1	AB005237	Хромозома 5 1707838
85-6	22_H2	AB005237	Хромозома 5 1707865
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	AC034107	Хромозома 1 23779041 (knock out)
89-9	22_G4	AL161540	Хромозома 1 6231582
89-18	22_F4	AL161540	Хромозома 1 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 18782145
91-16	26_H5	AB005237	Хромозома 4 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 генотипи. 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 не 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 локализиращи 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 конструкции повлияват експресията на представените в таблица 1 гени използвахме първоначално полуколичествен RT-PCR.

Семената бяха отглеждани в стерилни петриевеи блюда върху  $\frac{1}{2}$  MS agar без захароза в продължение на 4 седмици в климатична камера (температура 20 – 22° С, режим 14 ч светлина/10 ч тъмнина) (фиг. 23).

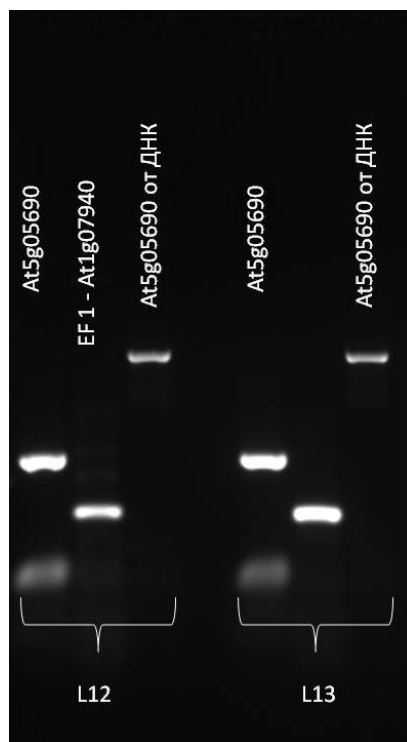
За изолиране на тотална РНК използвахме 50 милиграмови проби от всяка линия, които обработвахме с кит на RNeasy plant mini кит на Qiagen. Изолирането следваше приложения към кита протокол заедно с добавката за ДНК-азно третиране на колонките. РНК се съхранява в стерилна микроцентрифужна епруветка при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



Фиг. 16. Отглеждане на растения *Arabidopsis* върху  $\frac{1}{2}$  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  $\mu$ g на изолираните общи РНКи се смесват с 1  $\mu$ l от всеки прав и обратен ген- специфичен праймери (6 mmol.L<sup>-1</sup> концентрация) в 200 мкл епруветки PCR 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) (Cho и др., 1995) (Фиг. 16).

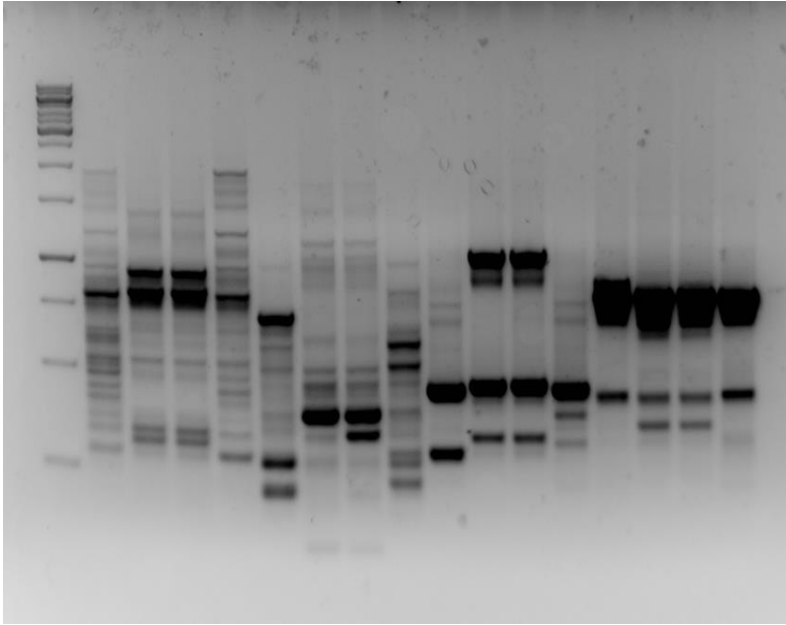
конструкцията е възможно част от растенията да имат конструкции разположени на приблизително едно и също място.



Фиг. 16. Сравнителен RT-PCR на линии експресиращи гена At5g05690. За сравнение е представена експресията на eEF1  $\alpha$ . За доказване на чистотата на РНК 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 провеждаха според метода описан от Liang и Pardee (1992). Обща РНК (3  $\mu$ g) се подлага на обратна транскрипция в краен обем от 25  $\mu$ l 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 разреждени (1:60) и 1  $\mu$ l аликвотни части се използваха като матрица за PCR. Differential display PCRa се провежда в 25  $\mu$ l 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° C, следват 30 цикъла на амплифициране при следните условия: 30 сек при 94° C, 2 минути при 40° C и 45 сек при 72° C, последвани от допълнителен период удължаване на продуктите в продължение на 5 минути при 72° C. 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 геловите 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 real-time 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 Biogad 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.

Таблица 6

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

Линия	Повлияни гени	Функция
1	At5g23970	Цитоплазмено локализирана НХХХD-тип ацил трансфераза. Не е известно с какви биологични процеси участва
2	At4g21980	Генът кодира APG8 –тип протеаза, която участва в процесите на автодеструкция при инфекции, формиране на проводящи тъкани и др.
	At4g21990	Генът кодира ензим с adenylyl-sulfate reductase activity. Място на активност - хлоропласти
	At4g22000	Генът кодира белтък с неизвестна функция. Установен е да се активира при процеси като клетъчна смърт и старее.
3	At5g11080	Убиквитин синтаза. Неизвестна функция
	At5g11070	Генът кодира потенциален рецепторен белтък реагиращ на брасиностероиди
4	At3g22180	DHHC-тип Zn-свързващ транспортен белтък. Palmitoyl transferase – локализирана в цитоплазмената мембрана
	At3g22183	Генът кодира белтък с неизвестна функция, локализиран с ендоплазматичната мембрана
	At3g22190	Генът кодира калмодулин свързващ 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 домейн, богат на цистеин. Неизяснени функции
6	At5g47090	Кодиращ протеин с неизяснени функции DUF2052,
	At5g47100	ATCBL9 – белтък отговорен за калций - медираната сигнализация при воден дефицит
7	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
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	Кодиращ член на семейството CP90A, на цитохром P450 моно оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone

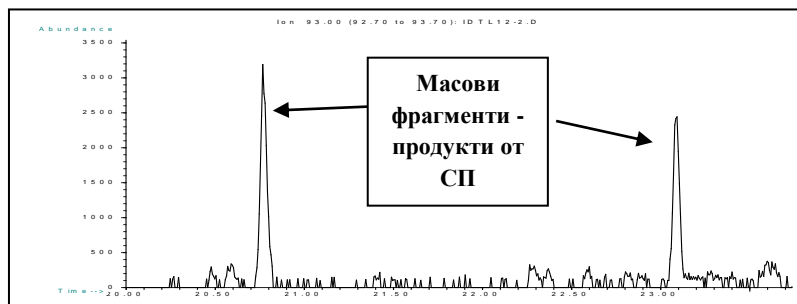
		в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на пътя С6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
13	At5g05690	Кодира член на семейството CP90A, на цитохром P450 моно оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на пътя С6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
14	At5g05690	Кодира член на семейството CP90A, на цитохром P450 моно оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на пътя С6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
15	At5g05690	Кодира член на семейството CP90A, на цитохром P450 моно оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на пътя С6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
16	At5g05690	Кодира член на семейството CP90A, на цитохром P450 моно оксигеназите, които превръщат 6-deoxocathasterone до 6-deoxoteasterone в края на пътя С6 окисление и cathasterone в teasterone в началото на пътя С6 окислението при brassinolid-ната биосинтеза.
17	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
18	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
19	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
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 клетъчната диференциация
	At4g30074	Кодира член на групата на малките, цистеин богата протеин секретирани от корена
23	At2g32270	Цинков транспортер 3. Експресира се в корените при дефицит на цинк или желязо
24	At5g23960	(-)-E-beta-carotophyllene synthase, Установена е повишена активност в отговор на атака от растителноядни насекоми и фитопатогени. Участва в биосинтетичния път на сесквитерпените
25	At1g18100	Фосфатидилетаноламин - свързващ протеин. Експресира се преди всичко в преходната зана корен-хипокотил. Има АБК - чувствителна експресия
26	At5g23960	(-)-E-beta-carotophyllene synthase, Установена е повишена активност в отговор на атака от растителноядни насекоми и фитопатогени. Участва в биотинтетичния път на сесквитерпените
27	At2g45580	Цитохром P450, от група 76С3. Има екстрацелуларна локализация
28	At2g45580	Цитохром P450, от група 76С3. Има екстрацелуларна локализация

29	At2g45580	Цитохром P450, от група 76C3. Има екстрацелуларна локализация
30	At5g23960	(-)-E-beta-caruophyllene 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-caruophyllene 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 показва че при повечето от устойчивите мутантни линии нямат промяна в количеството стимуланти на прорастването. Вероятно устойчивостта 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 продукцията на стимуланти на прорастване.
3. При три от линиите то е свързано с активиране на ядрено кодираната, хлоропластно локализирана E-beta-carotophyllene 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
5. Сред линиите, които проявяват устойчивост без промяна в продукцията на СП се открояват четири, при които е активиран генът, кодиращ цитохром P450 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. 21–24 Slavov 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, Romyana 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-carotophyllene синтаза и терпеноид циклаза), чиито продукти са локализиращи 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 P450 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 инсерция 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**).