



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО”



СИБЕЛ ДЖЕВДЕТ АЗИЗ

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНАТА ИЗМЕНЧИВОСТ ПРИ
ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА ЗЕЛЕНЧУКОВИ КУЛТУРИ ЧРЕЗ
МОЛЕКУЛЯРНИ МАРКЕРИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна степен
„доктор”

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

Докторска програма: Генетика

Научни ръководители:

Проф. д-р Теодора Атанасова Стайкова

Проф. д-р Нася Борисова Томлекова

Пловдив, 2023 г.

Експерименталната работа по дисертационния труд е осъществена с финансовата подкрепа на международни проекти с ръководител и главен координатор – проф. д-р Нася Томлева.
BUL/5/015 – ”Increasing productivity and quality of basic food crops”;
BUL/5/016 - ”Sustaining National efforts in improving the productivity and quality of selected crops through nuclear techniques”;
RER/5/024 - ”Enhancing productivity and resilience to climate change of major food crops in Europe and Central Asia”;
ERA-NET CORE Organic “Diversifying organic crop production to increase resilience” (DIVERSILIENCE), МОН - КП06ДО-02/7.
Финансиращи организации: Международна агенция за атомна енергия и Европейски съюз.

Дисертационният труд съдържа 200 печатни страници, 51 фигури, 26 таблици и 323 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Биология на развитието”, Биологически факултет, ПУ „П. Хилендарски“ (Протокол № 382 от 15.02.2023 г.).

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 27 април (четвъртък) 2023 г. от 13:30 часа в 15 аудитория на Биологически факултет (гр. Пловдив, ул. Тодор Самодумов № 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересувашите се в Централната библиотека на ПУ „Паисий Хилендарски” (ул. Цар Асен № 24).

Научно жури:

Председател: Проф. д-р Евгения Нешова Иванова

Членове: Проф. д-р Дияна Лилова Светлева – рецензент
Проф. д-р Цанко Савов Гечев - рецензент
Проф. д-р Светла Димитрова Янчева
Проф. д-р Вили Кръстева Стоянова

Автор: Сибел Джевдет Азиз

Заглавие: Изследване на генетичната изменчивост при представители на зеленчукови култури чрез молекулярни маркери.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията.....	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	4
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	6
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	7
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	9
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ	24
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	25
IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	28
ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА:	29

Списък на съкращенията

COS II	Conserved Ortholog Set II (Консервативен ортоложен набор II)
EMS	Ethyl Methane Sulfonate (Етил метан сулфонат)
ISAP	Inter-SINE Amplified Polymorphism (Полиморфизъм на амплифицирани междутранспозонни региони)
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat (Секвенция между прости повтори)
PIC	Информационно съдържание на полиморфизма
SINE	Short Interspersed Nuclear Elements (Къси разпръснати ядрени елементи)
SSR	Simple Sequence Repeat (Прости тандемни повторени последователности)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Доматите (*Solanum lycopersicum* L.) са с традиционно водещо стопаско значение сред зеленчуковите култури за България. Картофите (*Solanum tuberosum* L.) са зеленчукова култура, която е от голямо стопанско значение за човечеството. Обикновеният фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) е перспективна за бъдещото изхранване на човечеството бобова култура. Поради богатото си съдържание на протеини, включително на незаменими аминокиселини, през последните години бобовите култури са целеви за всички световни и европейски финансиращи организации.

Въпреки наблюдаваното фенотипно разнообразие при домати, картофи и фасул, генетичната вариабилност на тези видове се определя като ниска. Причината е отглеждането на малък брой сортове, носещи поголеми приходи за земеделските производители.

Индукцираният мутагенезис е надеждна технология за преодоляване на ограничениата на ниската генетична изменчивост в растенията. Създаването на нови сортове домати, картофи и фасул, притежаващи висок потенциал за добив, устойчиви на важните за стопанството на страната ни болести и неприятели, както и толерантност към абиотични фактори на средата е от съществено значение.

Успешната селекция на растителните видове е пряко свързана със съществуващото генетично разнообразие, както и неговото поддържане и управление.

Основен приоритет при зеленчуковите култури е оценяването на генотипи с ценни стопански качества. Прилагането на различни молекулярни техники за оценка на генетичния потенциал на даден културен вид увеличава и ускорява ефективността на мутационната и традиционната селекция. Въвеждането на молекулярните техники за изследването на растителните културни видове предоставя полезна информация във връзка със защитата на авторски права, установяването на съществуващо генетично разнообразие, идентифицирането на хибридната природа, както и при откриването на ново генетично разнообразие.

Правилният избор на подходящи молекулярно-маркерни системи, засягащи високо вариабилните области в генома, е от голямо значение за установяване на генетичната хетерогенност. Микросателитите, ретротранспозоните и рестрикционните сайтове засягат силно вариабилни региони в генома на растенията. Ефективни са също така и техники, с които се установяват единични нуклеотидни замени в генома, особено в кодиращите региони.

Настоящото дисертационно изследване, в което е използван набор от молекулярно маркерни техники за генетичната изменчивост при трите зеленчукови култури, разкрива перспективи както във фундаментален, така и в приложен аспект.

Установяването на подходящи ДНК маркери за генотипиране, дава възможност да се отсеят фенотипните изменения, които са резултат от действието на факторите на околната среда, така че селекционният процес да се базира на генетична изменчивост.

Установяването на специфични полиморфни профили и маркери за генотипиране на образци от домати, картофи и фасул, които да бъдат прилагани в ранен етап от развитието на растенията, би позволило ускоряване на селекционния процес.

Това би имало голямо значение за производството на трите зеленчукови култури в нашата страна, базирано на съвременни молекулярно-генетични методи, както и за възстановяване на статута на България като европейски лидер в производството и износа на зеленчукови култури.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор включва 6 основни точки, като в първите 3 от тях последователно се разглежда значението на зеленчуковите култури, приложението на мутагенезиса и молекулярно – генетичните маркери в растителните биотехнологии. Останалите 3 точки акцентират върху стопанско значение на домати, картофи и фасул в световен мащаб, включително в България, както и приложение на молекулярните маркери за изследване на генетичната изменчивост при тези култури, обект и на дисертационния труд.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

- **Целта на настоящия дисертационен труд бе да се направи подбор на молекулно-маркерни системи за генотипиране на зеленчуковите култури - домати, картофи и фасул и въз основа на това да се анализира генетичната изменчивост при избрани техни представители.**

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

1. Подбор и изпитване приложимостта на различни молекулно-маркерни техники (SSR, ISSR, ISAP, COS II) за генотипиране на домати, мутантни линии картофи и фасул от колекцията на ИЗК „Марица”.
2. Изследване нивото на полиморфизъм при сортове и F₁ хибридни линии домати от културния вид *Solanum lycopersicum* L. и сортове, получени с участие на дивите видове *S. pimpinellifolium* L. и *S. chilense* L. чрез прилагане на SSR, ISSR, ISAP и COS II молекулярни техники.
3. Изследване нивото на полиморфизъм при мутантни линии картофи от вида *Solanum tuberosum* L. посредством маркерните системи SSR, ISSR и ISAP
4. Изследване степента на полиморфизъм при образци фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) чрез прилагане на микросателитни маркери (SSR и ISSR).
5. Сравняване на ефективността на приложените техники при всеки един от изследваните видове.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Материали

4.1.1. Растителен материал

Изследвани бяха:

1. 4 F₁ хибриди, 3 български сорта и 4 селекционни линии домати от вида *S. lycopersicum* L. и два сорта, получени чрез междувидова хибридизация (*S. lycopersicum* L. x *S. pimpinellifolium* L.; *S. lycopersicum* L. x *S. chilense* L.).
2. 16 EMS индуцирани мутантни линии картофи (*S. tuberosum* L.), техните родители и контроли.
3. 16 EMS - индуцирани мутантни линии градински фасул (*P. vulgaris* L.) от популацията на сорт „Мастилен 11 б” от колекцията на ИЗК „Марица”.
4. 20 местни образци и селекционни линии фасул (*P. vulgaris* L.).

4.2. Методи



4.2.1. Изолиране на ДНК

За изолиране на ДНК използвахме млади листа (първи същински лист) от домати, картофи и фасул, стрити в хавани с течен азот. Изолирането на ДНК проведохме чрез три протокола – СТАВ, Microprep, Nucleon PhytoPure Kit.

4.2.2. PCR амплификации

4.2.2.1 PCR амплификации чрез микросателит-базирани SSR реакции

Всички PCR амплификации на геномна ДНК бяха проведени в 20 μL реакционен обем, съдържащ 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ геномна ДНК, 1x PCR буфер, 10 μM от всеки праймер, 0,2 mM от всеки dNTP, 1,5 mM MgCl_2 и 0,5 U от *Taq* ДНК полимеразата. Условието за амплификация включват:

Начална денатурация – 94 $^\circ\text{C}$ за 5 мин, денатурация – 94 $^\circ\text{C}$ за 30 сек, анийлинг 45 сек, с температури от 50 – 55 $^\circ\text{C}$, елонгация – 72 $^\circ\text{C}$ за 45 сек, 35 цикъла и крайна елонгация 72 $^\circ\text{C}$ за 10 мин.

4.2.2.2 PCR амплификации чрез микросателит-базирани ISSR реакции

Реакциите на амплификация са проведени в общ обем 25 μL . Реакционната смес съдържа 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ от ДНК матрицата, 1x Green PCR, 0,2 mM dNTPs, 10 μM primers от съответните праймери и 0,5 U Dream*Taq* ДНК полимеразата.

Условието за амплификация включват: Начална денатурация – 94 $^\circ\text{C}$ за 5 мин, същинска денатурация – 94 $^\circ\text{C}$ за 30 сек, анийлинг 45 сек, с температури от 48 – 56 $^\circ\text{C}$, елонгация – 72 $^\circ\text{C}$ за 2 мин, 35 цикъла и крайна елонгация 72 $^\circ\text{C}$ за 7 мин.

4.2.2.3. PCR амплификации чрез SINE ретротранспозон - базирани - ISAP реакции

Реакциите на амплификация бяха проведени в общ обем 20 μL . Реакционната смес съдържа 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ от ДНК матрицата, 1x Green PCR buffer (Thermo Scientific, Cat. No B71, Литва), 0,2 mM dNTPs, 0,15 μM от съответните праймери, 0,1 mg/mL говежди серумен албумин и 0,5 U Dream*Taq* ДНК полимеразата.

Условието за амплификация включват: Начална денатурация – 93 $^\circ\text{C}$ за 5 мин, същинска денатурация – 93 $^\circ\text{C}$ за 20 сек, анийлинг 30 сек при 52 $^\circ\text{C}$, елонгация – 72 $^\circ\text{C}$ за 2 мин, 30 цикъла и крайна елонгация 72 $^\circ\text{C}$ за 7 мин.

4.2.2.4. PCR амплификации чрез COS II – реакции при домати

Реакциите на амплификация бяха проведени в общ обем 50 μL . Реакционната смес съдържа 50 ng/ μL от ДНК матрицата, 10x Green PCR buffer, 2 mM dNTPs, 10 μM от съответните праймери, 25 mM MgCl_2 и 0,5 U DreamTaq ДНК полимераза.

Условията за амплификация включват: Начална денатурация – 94 °C за 5 мин, същинска денатурация – 94 °C за 1 мин, анилинг от 50 – 55 °C за 1 мин, елонгация – 72 °C за 2 мин, 35 цикъла и крайна елонгация 72 °C за 10 мин.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследване на генетичната изменчивост при домати, картофи, фасул чрез прилагане на молекулно-маркерни техники

5.1. SSR анализ при домати

Таблица 1. Полиморфни SSR профили при образци домати.

Маркери	SSR профили								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
SSR19	1	1	2	2	3	3	3	1	4
SSR22	1	1	2	1	2	3	4	2	3
SSR38	1	2	3	4	1	3	3	1	1
SSR40	1	2	1	1	1	3	2	4	4
SSR51	1	1	1	2	3	4	5	6	7
SSR61	1	2	2	2	2	3	4	4	2
SSR76	1	2	3	4	5	1	1	1	1
SSR80	1	2	3	2	2	1	2	1	1
SSR96	1	2	3	3	2	3	3	1	1
SSR124	1	1	1	2	1	2	3	3	1
SSR150	1	2	1	3	4	1	1	1	1
SSR223	1	1	1	1	1	2	1	1	1
SSR270	1	1	1	1	1	2	2	2	2
SSR356	1	2	3	4	3	3	5	6	7
SSR586	1	1	1	2	1	1	1	1	1

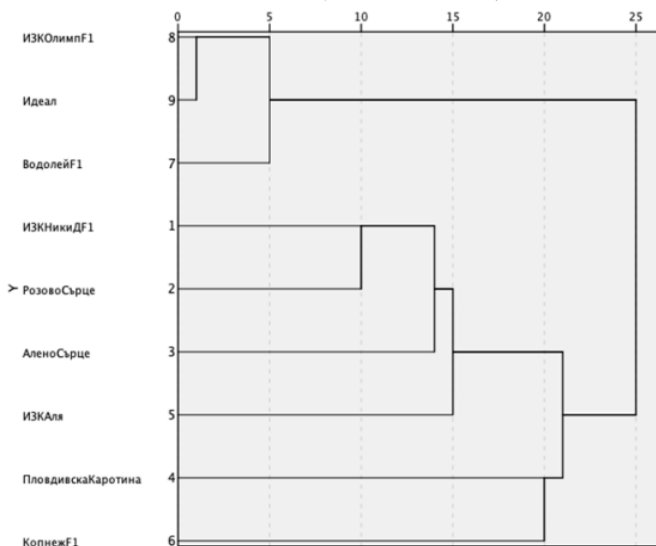
* Римските цифри съответстват на изследваните сортове и F₁ хибриди.

I - „ИЗК Ники Д” F₁; II - „Розово сърце”; III - „Алено сърце”; IV - „Пловдивска каротина”; V - „ИЗК Аля”; VI - „Копнеж” F₁; VII - „Водолей” F₁; VIII - „ИЗК Олимп” F₁; IX - „Идеал” F₁.

*Арабските цифри съответстват на различните генерирани профили.

От дендрограмата се вижда, че сорт „Копнеж” F₁ е отделен в самостоятелен клон, а другите осем от образците са групирани в един клъстер, който се разделя на два подклъстера (Фигура 1). Първият подклъстер включва генотипите „Водолей F₁” „ИЗК Олимп” F₁ и „Идеал”. Вторият подклъстер се разделя на други два подклъстера. Единият включва сортът „Пловдивска каротина”, а другият - „ИЗК Аля”, „Алено сърце”, „Розово сърце” и „ИЗК Ники Д” F₁.

Резултатите, получени в дисертационния труд, показват, че всички сортове и хибриди, създадени само от представител(и) на вида *S. lycopersicum* L., са групирани в един основен клъстер. Изключение представлява F₁ хибрида „Копнеж”, който е групиран в самостоятелен клон и се намира в най-голяма близост до два сорта, чиито произход се свързва с диви видове – „Пловдивска каротина”, получен чрез междувидова хибридизация между културния вид *S. lycopersicum* L. и дивия вид *S. chillense* L., и „ИЗК Аля”, който е създаден чрез междувидова хибридизация на културния вид с дивия вид *S. pimpinellifolium* L.



Фигура 1. UPGMA дендрограма, показваща генетичната отдалеченост между изследваните образци домати на база генерираните SSR данни.

При разпределението чрез клъстерния анализ и двата сорта с междувидов хибриден произход попадат в една подгрупа (Фигура 1).

Те се различават от останалите изследвани сортове и по своите морфологични особености.

Извършеният клъстерен анализ, базиран на SSR микросателитни маркери, потвърди ясното отдиференциране на сортовете, при чието създаване са използвани кръстоски на културния вид с диви видове от тези, които от представителите на културния вид. Двата сорта с див произход са анализирани със SSR маркери и от Todorovska et al. (2014), които установяват, че „ИЗК Аля” се различава от всички останали образци и формира собствен клъстер в UPGMA дендрограмата. Данните за амплифицирания мономорфен профил при образците домати с използване на SSR 66 маркера в това проучване корелират с резултатите на Gharsallah et al. (2016), които съобщават за относително нисък полиморфизъм, констатиран със същия маркер. Докладваните от екипа резултати за други SSR маркери, изследвани и от нас (SSR 19, SSR 22) също съвпадат с получените в дисертационния труд резултати.

При изследване на седем инбредни линии домати с 30 SSR маркера, през 1997 Smulders et al. констатира средно по 3 алела на локус. При проучване чрез 65 полиморфни SSR маркери на 17 сорта и 2 родителски линии домати He et al. (2003) установяват средно 2,7 алела на локус. Garcia-Martinez et al. (2006) съобщават за 19 полиморфни локуса и открити от 2 до 10 SSR алели при изследване на 48 образци домати.

В хода на разработването на настоящия дисертационен труд с помощта на 19 SSR маркери ние установихме 63 алели и генетично сходство между изследваните образци в границите от 0,000 до 1,000. Изчислената генетична отдалеченост между изследваните F_1 хибриди и останалите сортове, показва, че F_1 хибрида „Копнеж” е най-отдалечен, както от другите изследвани F_1 хибриди, така и от останалите сортове. Отчетената дистанция между този сорт и „ИЗК Аля” е 0,707, а между него и „Пловдивска каротина” – 0,791, за разлика от другите изследвани образци, спрямо които стойността е по-висока.

Чрез изследването на 9 сорта домати с помощта на 15 полиморфни SSR маркери ние установихме средна стойност на информационното съдържание на полиморфизма $PI_C=0,542$, и средна хетерозиготност $H=0,597$. Aguirre et al. (2017) докладват за установени шест алела по SSR19 маркера и стойност на $PI_C=0,782$.

В хода на нашето проучване при подобраните сортове домати, с този маркер констатирахме четири алела и среден индекс на полиморфизъм (PIC) – 0,714, което предполага висока генетична вариабилност.

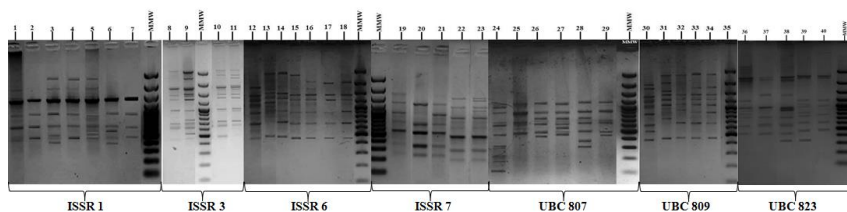
Генетичната вариабилност при домати, установена от Popescu et al. (2022) е доста висока, което вероятно се дължи на изследвания разнороден материал, включващ детерминантни и индетерминантни сортове и хибриди. Изследваният от нас растителен материал включва 5 индетерминантни, 3 детерминантни и 1 полудетерминантен сорт домати с еднакъв географски произход, част от българската колекция, създадени и поддържани в ИЗК „Марица”, сред които констатирахме по-ниски стойности на полиморфизъм.

Проведеният от нас анализ чрез 19 SSR реакции показва, че степента на генетично сходство между изследваните образци варира от 0,018 до 0,617, което потвърждава наличието на генетична вариабилност сред тях независимо, че в по-голямата си част те принадлежат към един вид.

Най-високи стойности на генетично сходство установихме между „ИЗК Ники Д” F₁ и „Розово сърце”, както и между „ИЗК Ники Д” F₁ и „Алено сърце”.

5.2. ISSR анализ при домати

Изследваните 11 генотипи домати, създадени в ИЗК „Марица” бяха анализирани с 13 ISSR реакции, като със 7 от тях установихме полиморфни профили, амплифициращи общо 105 фрагменти с дължини от 250 бд до 3100 бд (Фигура 2).



Фигура 2. Полиморфни ISSR профили при домати от колекцията на ИЗК „Марица”. *MMW – маркер за определяне дължината на фрагментите (Gene Ruller 100 bp Plus).

С по-голяма част от проведените ISSR реакции при домати успяхме да разграничим пет сорта - „ИЗК Ники Д” F₁, „Копнеж” F₁, „Пловдивска каротина”, „Розово сърце” и „Алено сърце”.

С някои от реакциите сорт „ИЗК Аля”, произхождащ от междувидова кръстоска на културния вид със *S. pimpinellifolium* също амплифицира индивидуален профил. Установената средна стойност на PIC= 0,353 полиморфизъм потвърждава възможността за прилагане на ISSR техниката при идентифициране на сортове от един вид, както и при видове с дива ген плазма, които да се включат в селекционните програми. Нивото на констатиране чрез посочените по-горе ISSR маркери полиморфизъм сред подбраните образци домати е по-ниско от установеното със същите маркери при мутантни линии фасул (Aziz et al., 2022). В свое проучване Tomleкова et al. (2012) съобщават за пет полиморфни фрагмента, амплифицирани с два ISSR праймера, които са установени при сравнителни изследвания на изходен и мутантни генотипове домати. В изследвания на Vargas et al. (2020) при анализиране на 55 образци домати, посредством 7 ISSR реакции, са амплифицирани общо 63 фрагмента и е установено много високо ниво на полиморфизъм - 90,48%. Ceballos-Aguirre et al. (2017), съобщават за подобни резултати като при анализиране на 30 интродуцирани чери домати с 36 микросателитни маркера откриват голямо генетично разнообразие ($H_e = 0,6946$). Sharifova et al. (2017) докладват за изследване на 41 генотипа домати с 11 ISSR маркера, като установяват общо 50 амплифицирани фрагменти, сред които 32 полиморфни. Процентът на полиморфизъм варира от 50% до 90%, а средният брой полиморфни фрагменти е 4,0. Избраните 7 ISSR маркери отразяват значителен генетичен полиморфизъм и дават ценна генетична информация, което показва тяхната ефективност при диференцирането на различни образци домати. Установеният полиморфизъм на базата на изследваните маркери при домати варира от 36,4% до 64%.

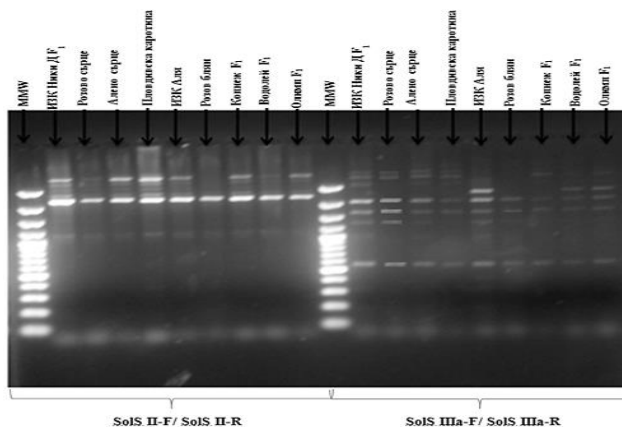
5.3. ISAP анализ при домати

За маркерната система ISAP е доказано, че е много специфична и въпреки, че като цяло не е популярна в растителната генетика, тя е добра за използване на наличните геномни ресурси и бази данни.

В свои проучвания Seibt et al. (2012, 2016) разкриват, че делът на генома, покрит от подвижните SINE елементи варира между видовете, като при картофите е два пъти по-голям, отколкото при другите изследвани видове от семейство Solanaceae. Това твърдение ни дава основание да смятаме, че избраният ISAP метод е подходящ за прилагане при сортове домати, но използваните в настоящото изследване SINE елементи, не са предназначени за генома на домати.

Необходимо е да се направи по-нататъшно търсене на характерни SINE семейства, които могат да послужат за проектиране на праймери за амплификации в генома на домати, както и тяхната последваща молекулярна идентификация.

Дизайнът на ISAP праймери, обаче изисква обширна предварителна геномна информация за SINE елементите. Най-успешните еднофамилни ISAP реакции при домати бяха проведени със SINE фамилии SolS II и SolS IIIa. Сортовете „ИЗК Ники Д” F₁, ИЗК „Аля”, „Розов блян” и „Копнеж” F₁ се отличават с уникални ISAP профили (Фигура 3).



Фигура 3. Резултати от SINE–ISAP реакции при образци домати; **А** – SolS II–F/SolS II–R; **Б** – SolS IIIa–F/SolS IIIa–R.

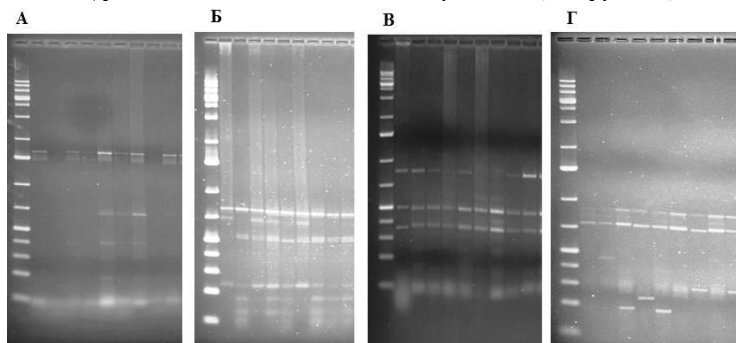
При изследване на SINE елементите в сем. Solanaceae, Seibt et al. (2016) разкриват, че генотипите на *Capsicum* съдържат най-висок брой копия с 21 398 SINE.

За домати констатираме, че отсъстват копия със SolS VI фамилия, докато при всички изследвани видове Solanaceae, в семейство SolS II изобилието е най-високо, вариращо като брой копия от 2479 (при домати) до 7044 (при пипер "Zunla-1"). При домати са установени голям брой копия и със SINE – IIIa фамилия (1177), за разлика от пипер (225).

5.4. COS II анализ при домати

След прилагане на рестрикционен ензим *DraI* при реакция c2_At2g45620 установихме два амплификационни профила при българските сортове домати. Към първия профил се отнасят „ИЗК Ники Д” F₁, „Алено сърце”, „Пловдивска каротина” и „Идеал”, а към втория

молекулярен профил – „ИЗК Аля”, „Копнеж” F₁, „Водолей” F₁. След прилагане на рестрикционно срязване, при сортовете „Розово сърце” и „Олимп” F₁, установихме липсата на амплификации (Фигура 4 А).



Фигура 4. COS II реакции след прилагане на рестрикционни ензими.

А) c2_At4g45620; **Б)** c2_At4g00090; **В)** c2_At5g64350; **Г)** c2_At5g53000

След прилагане на рестрикционен ензим *DpnII* при реакция c2_At4g00090 идентифицирахме пет амплификационни профили. Към първия принадлежи „ИЗК Ники Д” F₁, вторият профил включва генотипи „Розово сърце”, „Водолей” F₁, „Олимп” F₁ и „Идеал”. Третият молекулярен профил е характерен за „Алено сърце”, „Копнеж” F₁, а останалите два сорта („Пловдивска каротина”, „ИЗК Аля”) генерират индивидуални профили (Фигура 4 Б). С реакция c2_At5g64350 установихме два профила след прилагане на рестрикционен ензим *Hae III*. Към първия са включени два сорта – „ИЗК Аля” и „Копнеж” F₁, а вторият молекулярен профил е амплифициран при всички други седем изследвани образци домати (Фигура 4 В). При COS II реакция – c2_At5g53000 след прилагане на рестрикционен ензим *TaqI* се амплифицират 9 полиморфни фрагменти, с които са идентифицирани шест молекулярни профили. Пет от тях са индивидуални („ИЗК Ники Д” F₁, „Розово сърце”, „Пловдивска каротина”, „ИЗК Аля” и „ИЗК Олимп” F₁). Останалите четири генотипа амплифицират еднакъв мономорфен профил с тази реакция (Фигура 4 Г). Чрез шест от проведените осем въведени COS II маркери са идентифицирани българските сортове домати „Пловдивска каротина” и „ИЗК Аля”.

С по-голяма част от реакциите е установен полиморфизъм сред представители на културния вид („ИЗК Ники Д” F₁, „Розово сърце”, „Алено сърце”, „Копнеж” F₁, „Идеал”).

При бъдещи проучвания ще се разширят познанията за търсене и установяване на генетичното разнообразие при изследваните образци, както и ще бъдат използвани допълнителни COS II маркери, локализирани близо до гени, свързани с антоцианините.

Това ще позволи и характеризирането на качеството на българските сортове и линии домати за задоволяване вкусовите потребности на консуматора.

5.5. SSR анализ при картофи

Чрез осем SSR реакции, изследвахме генетичната изменчивост при мутантни линии картофи, техните изходни форми и контроли. Броят на амплифицираните фрагменти, които установихме, варира от 1 до 4 (Таблица 2), а броят на полиморфните профили от 3 до 7 (Таблица 3).

Таблица 2. Брой амплифицирани фрагменти и профили със SSR маркери при картофи.

SSR маркери	G	PF	PP	PP %
STM1052	24	2	4	16,67
STM0031	24	3	4	16,67
STM0037	24	3	3	12,5
STM3012	24	2	3	12,5
STI42	24	2	3	12,5
STI53	24	4	7	29,17
STI57	24	3	5	20,84
STI58	24	3	3	12,5
Средно		3,93	3,80	16,67

SSR данните бяха статистически обработени чрез софтуер NTSYS-2.2j, с опция Ultrametric Dissimilarity. Построихме UPGMA-базирана дендрограма, използвайки коефициента на Nei и Li. Освен това приложихме допълнителен статистически анализ за изчисляване на коефициента на матричната корелация сред изследваните образци картофи. Обобщените резултати от теста на Mantel (Mantel, 1967), въз основа на регресионен анализ, в който променливите са матрици за несходство (или сходство) на разстоянието, показват 276 точки за идентификация, със стойност на матричната корелация $r = 0,76267$.

В хода на нашето проучване при използването на 8 SSR маркера, констатирахме средно 4 алела на полиморфен локус и средна стойност на PIC= 0,502. Ghislain et al. (2004) изследват 156 SSR маркери, които позволяват идентифицирането на 18 от тях като високо информативни и лесно приложими при характеризирането на генетични ресурси от картофи. Авторите докладват PIC стойност 0,786, установена чрез използването на SSR маркер STM0037 при 931 образци картофи. Със същия маркер при включените в настоящото изследване образци картофи от българската колекция ние установихме PIC стойност 0,456. Ashkenazi et al. (2001) успяват да разграничат 12 сорта картофи чрез използването на 2 SSR маркера, като установяват средно 5 алела на полиморфен локус. В хода на нашето проучване при използването на описаните 8 SSR маркера, ние констатирахме средно 4 алела на полиморфен локус. В нашето проучване ние установихме 3 алела с реакция STM0037, с дължина на амплифицираните фрагменти от 90 до 120 бд.

С уникален профил на базата на този маркер беше идентифициран единствено един от изходните компоненти на първа и четвърта мутантна група – ПС428, с дължина на фрагмента 90 бд. Стойността на информационно съдържание на полиморфизма (PIC) беше равна на 0,475. Tiwari et al. (2018) докладват и за установени 13 алела с реакция STM0031 и PIC=0,863, показващ голямо генетично разнообразие сред изследваните образци, докато в проучване на Tilault and Yevtushenko (2019) установената стойност на PIC с този маркер е 0,674, с генерирани 4 алела на локус и амплифицирани фрагменти с дължина от 158 до 192 бд. Подобно на тези резултати със същия маркер ние установихме четири алели и PIC=0,456 при изследваните от нас мутанти, техните родители и контроли.

5.6. ISSR анализ при картофи

ISSR техниката се оказва благодатна при анализиране на българската колекция от мутантни линии картофи. Бихме препоръчали използването на този метод за изследване на генетичната изменчивост, за идентифициране на сортове и линии, както и за ускоряване на селекционния процес при картофи. От 12 изследвани реакции, с 10 установихме полиморфни профили (Таблица 4).

Установената от нас средна стойност на полиморфизма с 10 ISSR реакции при 24 генотипа картофи е 44,16 %.

Таблица 3. Резултати от SSR реакции при мутантни линии картофи, техните изходни форми и контроли.

Маркери	I	I I	II I	IV	V	VI	VI I	VI II	IX	X	XI	XI I	XI II	XI V	X V	X VI	X VI I	XVI II	XI X	X X	X XI	XXI I	XXI II	XXI V
STM1052	1	1	1	2	2	3	4	1	2	1	2	2	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
STM0031	1	2	2	3	4	3	3	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	5	5	1	1	1	1
STM0037	1	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
STM3012	1	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
STI42	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
STI53	1	2	3	4	5	3	4	6	3	3	6	3	3	3	5	5	3	3	5	6	7	7	3	3
STI57	1	2	2	1	3	4	1	4	4	4	1	4	4	1	1	1	4	1	1	1	5	1	1	2
STI58	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1

** I – ПС 428; II – ПС 490; III – M-I-3; IV – M-I-8; V – M-I-17; VI – M-III-8; VII – M-III-9; VIII – M-III-25; IX –

M-III-30; X – M-III-48; XI – M-III-50; XII – K-III-2; XIII – M-IV-14; XIV – M-IV-15; XV – M-IV-17; XVI – K-IV-3; XVII – ПС 707; XVIII – ПС 538; XIX – ПС 757; XX – M-VII-7; XXI – M-VII-9; XXII – M-VII-19; XXIII – M-VII-27; XXIV – K-VII-4

Най-информативна се оказа при нашите изследвания STI53 реакция, с която идентифицирахме 7 полиморфни профила..

Таблица 4. Амплифицирани полиморфни ISSR маркери при картофи (*S. tuberosum* L.).

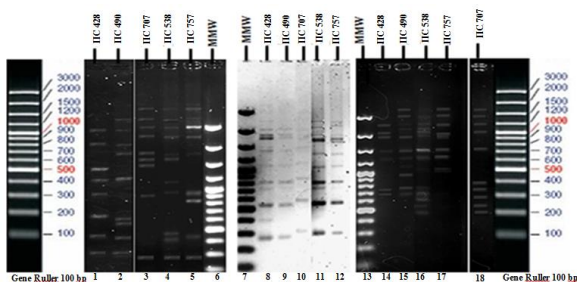
ISSR маркери	G	PP	PP %	T	Дължина на фрагментите (бд)
ISSR 1	24	17	70,8	17	400 - 2100
ISSR 2	24	5	20,8	15	200 - 1400
ISSR 5	24	19	79,2	19	200 – 3000
ISSR 6	24	10	41,7	13	200 – 2000
ISSR 7	24	6	25,0	9	200 – 1000
ISSR 8	24	10	41,7	10	500 – 2800
ISSR 9	24	6	25,0	7	200 – 700
ISSR 10	24	5	20,8	12	250 - 2000
UBC807	24	11	45,8	11	480 - 1600
UBC 823	24	17	70,8	13	350 - 2800
Средно		10,6	44,16	12,6	

* G – Брой на анализираните генотипове, PP - Полиморфни профили, PP % – Процент на полиморфни профили, T – Общ брой фрагменти.

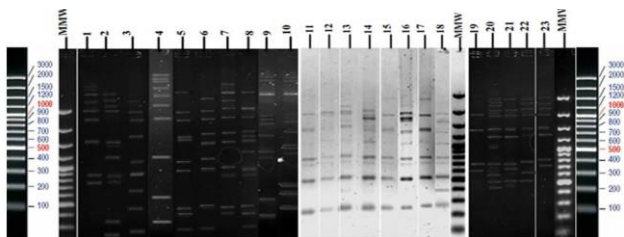
5.7. ISAP анализ при картофи

На базата на получените мономорфни и полиморфни амплификационни ISAP профили, изходните генотипи от всяка мутантна група бяха идентифицирани с уникални профили (Фигура 5).

Резултатите от анализите на мутантни линии от колекцията на ИЗК „Марица“ с двете най-информативни SINE семейства (SolS-IIIa и SolS-IV), проведени като еднофамилни и мултиплексни реакции, показаха високо ниво на полиморфизъм сред подбраните мутантни линии картофи (Фигура 6).



Фигура 5. Амплифицирани профили на изходните генотипове картофи чрез ISAP реакции. Профили: 1 – 5 (SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R); Профили 8 – 12 (SolS-IV-F/SolS-IV-R); Профили 14 – 18 (SolS-IIIa-F/SolS-IV-R); Стартове 6, 7, 13 – ДНК маркер (Gene Ruler 100 bp).



Фигура 6. Амплифицирани полиморфни профили при мутантни линии картофи чрез ISAP реакции. SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R (стартове 1 – 10); SolS-IV-F/SolS-IV-R (11 – 18); SolS-IIIa-F/SolS-IV-R (19 – 23)

Използваното в дисертационния труд ISAP генотипиране се основава на откриване на присъствие/отсъствие на SINE елементи в конкретен локус (Schmit et al., 1998). Според Seibt et al. (2012), SINE SolS-IIIa и SolS-IV са най-често срещаните в генома на картофите, което показва, че ISAP реакциите с тези праймери ще имат най-голям потенциал за генотипиране и идентифициране на образци картофи. Изследването на Tomleкова et al. (2017), проведено с български сортове, както и получените в дисертационния труд резултати при мутантни линии картофи потвърждават това твърдение. Въз основа на получените от нас резултати, можем да обобщим, че **праймерните двойки SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, SolS-IV-F/SolS-IV-R и SolS-IIIa-F/SolS-IV-R, използвани за ISAP амплификации в настоящото проучване, позволиха генерирането на високополиморфни профили.**

Ретротранспозонните SINE – ISAP маркери приложени при мутантни линии картофи показват висока чувствителност и успяват да разграничат всички изходни форми, включени в настоящото проучване на картофи, както и част от мутантните линии.

Получените от нас резултати доказват потенциала и точността на техниката ISAP за извършване на прецизно генотипиране при представители на *S. tuberosum* L., както и за идентифициране на тясно свързани генотипове.

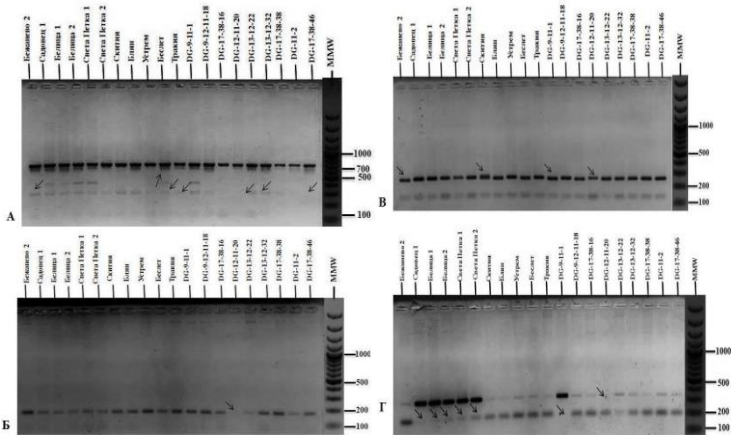
5.8. SSR анализ при местни образци фасул

В хода на изследванията проведени с местни образци фасул чрез 7 SSR реакции, установихме, че четири от тях амплифицират полиморфни профили, а останалите три реакции – мономорфен профил. Чрез четири микросателитни SSR маркери при 20 образци фасул е констатиран полиморфизъм, като са идентифицирани селекционните линии - „ДГ-13-12-22”, „ДГ-17-38-16”, „ДГ-17-38-46”, „ДГ-12-11-20”, както и сорт „Скития”.

Изчислената средна стойност на PIC=0,438. Според генерираните данни, най-висок коефициент на генетична отдалеченост се наблюдава между генотипи „Скития” и „ДГ-9-11-1”. Генотипи „Садовец”, „Белица 1”, „Белица 2”, „Света Петка 1” показват най-високи стойности на генетична отдалеченост спрямо селекционни линии – „ДГ-17-38-16” и „ДГ-17-38-38”.

По данни на Blair et al. (2012) очакваната дължина на амплифицирания фрагмент с реакция BmD158 е 186 бд. В хода на нашето проучване ние констатирахме два амплифицирани фрагмента с дължини ~200 бд и 380 бд. При селекционна линия – „ДГ-9-11-1”, „Садовец 1”, „Белица 1” установихме липсата на фрагмент с дължина ~200 бд, докато при „ДГ-12-11-20” липсва фрагмент с дължина 380 бд. При останалите образци се амплифицират и двата фрагмента, но с различна интензивност.

За изследване на полиморфизма при 51 образци фасул, Zargar et al. (2016), използват SSR маркери, посочени в предишни проучвания на Yu et al. (2000), Gaitan-Solis et al. (2002), Grisi et al. (2007), Hanai et al. (2010), Córdoba et al. (2010). Авторите установяват средно 11,65 алела на локус. В нашето проучване средният брой алели на локус е 2,43.



Фигура 7. Амплифицирани полиморфни SSR профили при местни образци фасул. * ДНК маркер (MMW) – Gene Ruller 100 bp Plus; А) BmD128; Б) BmD143; В) BmD156; Г) BmD158

5.9. ISSR анализ при фасул

Получените от нас резултати демонстрират приложимостта на техниката ISSR като ефективен метод за идентифициране на мутантни линии фасул и диференциране дори на тясно свързани генотипи. Най-висок процент полиморфни профили сред изследваните мутанти установихме чрез ISSR 2T, ISSR 4, ISSR 5 и UBC809 реакциите (Таблица 5).

ISSR маркерите се оказват важен инструмент за откриване на вътревидов полиморфизъм и са много перспективни за практическо приложение. В свое проучване, Tomleкова et al. (2012), съобщават за 5 полиморфни фрагмента, получени с два ISSR праймера, генерирани при изходния и мутантния генотип домати.

Сред изследваните от нас мутантни линии фасул и техния изходен сорт, всяка от тези реакции амплифицира три профила.

В проучвания на Tsonev et al. (2017) се съобщава, че при пипера има два невъзпроизводими праймера с тринуклеотидни повторения (ISSR 8 и ISSR 9). В нашето изследване с фасул тези праймери амплифицират мономорфните профили. Чрез две други реакции (ISSR7 и ISSR 12), ние констатирахме по-висок полиморфизъм, в сравнение с този, докладван от Tsonev et al. (2017) при пипер.

Таблица 5. Амплифицирани полиморфни ISSR маркери при фасул (*P. vulgaris* L.).

ISSR маркери	G	PP	PP %	T	Дължина на фрагментите (бд)	PF	P %
ISSR 1	16	8	50,00	17	300-2000	15	88,00
ISSR 2	16	3	18,75	8	200-2500	3	18,75
ISSR 2T	16	12	75,00	15	150-2000	13	87,00
ISSR 3	16	3	18,75	16	350-3100	6	37,50
ISSR 4	16	12	75,00	13	350-2000	13	100,00
ISSR 5	16	14	87,50	20	320-3000	18	90,00
ISSR 7	16	8	50,00	21	150-2000	15	71,40
ISSR 10	16	11	68,75	9	400-2800	6	66,60
ISSR 12	16	9	56,25	13	700-2100	10	76,90
UBC 807	16	5	31,25	17	300-2000	7	41,20

UBC 809	16	14	87,50	14	400-2800	12	85,70
---------	----	----	-------	----	----------	----	-------

* G = Брой на анализираните генотипове, PP = Полиморфни профили, $PP\%$ = Процент на полиморфни профили, T = Общ брой фрагменти, PF = Полиморфни фрагменти, $P\%$ = Процент на полиморфните фрагменти.

Получените от нас резултати демонстрират приложимостта на техниката ISSR като ефективен метод за идентифициране на мутантни линии фасул и диференциране дори на тясно свързани генотипи.

Установените и описани полиморфни профили, са добра отправна точка в бъдещи изследвания, тъй като биха могли да се използват за ранно идентифициране на мутантни генотипове, когато те се включват като изходен материал в различни селекционни програми. При проведените изследвания със SSR, ISSR, ISAP и COS II молекулярно-маркерните техники при домати, най-ефективни за разграничаване на образците се оказаха микросателит базираните техники – SSR, ISSR. С първата установихме средно 4,7 алела на локус и стойност на PIC = 0,542, а с втората средна стойност на PIC = 0,353, като идентифицирахме по 7 от анализираните 9 генотипа. Ретротранспозон базираната SINE – ISAP и COS II техники ни позволиха да разграничим 6 от сортовете домати.

Получените резултати при анализа на мутантни линии картофи, техните родители и контроли показват, че най-ефективни са микросателит базираната ISSR техника и ретротранспозон базираната ISAP техника.

Избраните микросателитни ISSR маркери доказаха своята ефективност и при изследване на мутантната колекция фасул, създадена и поддържана в „ИЗК Марица“

SSR, ISSR и ISAP реакциите показаха сравнително висок потенциал за изследване на генетичното разнообразие в избраните зеленчукови култури. Използването на по-голям брой информативни маркери би допринесло за установяване на по-висока генетична вариабилност сред образците.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ

Получените в дисертационния труд резултати чрез прилагане на различни молекулно-маркерни техники и тяхното обсъждане ни дават основание да формулираме следните заключения и изводи:

ЗАКЛЮЧЕНИЯ:

1. От приложените четири молекулно-маркерни техники при домати, като най-ефективна за установяване на полиморфизъм можем да посочим SSR, следвана от ISSR, COS II и ISAP.
2. От приложените три молекулно-маркерни техники при картофи, най-ефективни бяха ISAP и ISSR.
3. От приложените две молекулно-маркерни техники при фасул, ISSR техниката се оказа по-ефективна за установяване на полиморфизъм в сравнение със SSR.

ИЗВОДИ:

1. Установени са петнадесет SSR реакции от деветнадесет проведени при домати, с амплифицирани полиморфни профили. Чрез тях са идентифицирани седем от изследваните девет сорта.
2. Установени са седем ISSR реакции от тринадесет проведени при домати, с които се амплифицират полиморфни профили. Чрез тях са идентифицирани шест от деветте изследвани български сортове.
3. Чрез ISSR метода са разграничени представителите на културния вид (*S. lycopersicum*) от тези, получени чрез междувидова хибридизация между културния и диви видове (*S. pimpinellifolium*, *S. chilense*).
4. Чрез въвеждането за първи път при домати на ISAP молекулярния метод е доказан потенциалът на седем от SINE фамилии, като най-ефективни са SolS-II-F/SolS-II-R и SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R, с които са идентифицирани пет сорта домати.

5. Чрез шест от проведените осем COS II реакции са идентифицирани седем от деветте изследвани български сортове домати.
6. Чрез осемте проведени SSR реакции са установени предимно мономорфни и от три до седем полиморфни профили при изследваните генотипи картофи. Най-информативна е реакция STI53.
7. Чрез пет от проведените десет ISSR реакции при мутантни линии картофи, техните изходни форми и нетретирани контроли са установени високополиморфни профили. С пет от реакциите са разграничени девет от мутантните линии, както помежду им, така и спрямо изходните форми.
8. Приложените две еднофамилни и една мултиплексна ISAP реакции при мутантни линии картофи генерират високополиморфни профили, като всички изходни, пет от мутантните и два от контролните генотипи амплифицират уникални за изследваната колекция ISAP профили.
9. Чрез четири микросателитни SSR маркери при двадесет образци фасул е констатиран полиморфизъм, като са идентифицирани четири селекционни линии, както и един сорт.
10. Чрез единадесет от проведените четиринадесет ISSR реакции е установен висок полиморфизъм при изследваните шестнадесет мутантни линии фасул. Всички мутантни линии, както изходният сорт „Мастилен 11б” са идентифицирани с различни ISSR профили.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. Приноси с оригинален научен характер

1. За първи път е въведен ISAP метода за изследване генетичното разнообразие на домати. Използваните праймерните двойки SolS-II-F/SolS-II-R и SolS-IIIa-F/SolS-IIIa-R за ISAP реакциите демонстрират висок потенциал за идентифициране на полиморфни профили при културния вид.
2. За първи път ISAP молекулярният метод е приложен за изследване на генетичната изменчивост при български

мутантни линии картофи, техните изходни генотипи и контроли. С индивидуални амплификационни профили са идентифицирани всички родителски генотипи, пет мутантни и три контролни линии.

3. За първи път е приложен ISSR молекулярният метод за изследване на генетичната изменчивост при българската колекция мутантни и изходни форми картофи. Мутантните линии от отделните групи са разграничени помежду си, както и от изходните генотипи.
4. За първи път чрез единнадесет ISSR маркера са идентифицирани полиморфни профили при българските мутантни линии фасул с ценни стопански признаци, произхождащи от изходния сорт „Мастилен 116”.
5. За първи път е използвана COS II молекулно-маркерна система при български образци домати за изследване на генетичната им изменчивост.

7.2. Научно-приложни приноси

1. Доказана е приложимостта на SSR техниката за ранно идентифициране на образци домати, като установеният полиморфизъм би могъл да бъде използван в бъдещи селекционни програми.
2. Доказана е ефективността на ISAP и ISSR техниките за генотипиране на мутантни линии картофи, което би могло да се използва за ускоряване на мутационната селекция при тях.
3. Установените специфични SSR профили при фасул са с приложение за ранна идентификация на българските образци, ускоряване на селекционния процес, защита на авторските права и свободен трансфер на генетичен материал.
4. Установеното чрез ISSR маркери генетично разнообразие при напреднали (M_6) мутантни линии фасул, ускорява регистрирането на нови мутантни сортове.

7.3. Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е ефективността на ISAP реакциите за идентифициране на картофи при изследването на българската колекция от мутантни линии.
2. Потвърдена е ефективността на SSR маркерите за установяване на високополиморфни профили при домати.
3. Потвърдена е ефективността на ISSR маркерите за изследване на генетичната изменчивост на фасул.

7.4. Приноси с методичен характер

1. Въведени и изследвани са три молекулно-маркерни техники, базирани на микросателити (SSR и ISSR), и ретроинверсионни (ISAP) при мутантни линии картофи, създадени и поддържани в ИЗК „Марица”.
2. Въведени и изследвани са микросателит-базирани молекулярни техники (SSR и ISSR) при избрани български образци фасул.
3. SSR маркери, които са характерни за генома на домати (*S. lycopersicum* L.), са въведени за изследване на картофи (*S. tuberosum* L.).

IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Aziz, S.**, Kantoglu, Y., Tomlekova, N., Staykova, T., Ganeva, D., Sarsu, F. 2021.Characterization of tomato genotypes by simple sequence repeats (SSR) molecular markers. *Biharean Biologist*, 15 (2):142-148.Article No:e214501.eISSN:2065-1155; pISSN:1843-5637. **Q4**
2. **Aziz, S.**, Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Tomlekova, N. 2022. Assessing polymorphism within common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mutant lines originated from variety “Mastilen 11b” using Inter Simple Sequence Repeats markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 28(4):709–716. eISSN:2534-983X; pISSN: 1310-0351. **Q3**
3. Tomlekova, N., **Aziz, S.**, Nacheva, E., Weber, B., Raina, A., Seibt, K.M.2023. SINE-Markers as a Powerful Tool for Assessing Genetic Diversity to Improve Potato.*Advanced Crop Improvement, Volume 2 – Case Studies of Economically Important Crops* (eds. Aamir Raina, Mohammad Rafiq Wani, Rafiul Amin Laskar, Nasya Tomlekova, and Samiullah Khan. Springer Nature, Swetzerland AG. ISBN:978-3-031-26668-3 /под печат/.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Aguirre, N.C., López, W., Orozco-Cárdenas, M., Coronado, Y.M., Vallejo-Cabrera, F. 2017. Use of microsatellites for evaluation of genetic diversity in cherry tomato. *Plant Breeding Bragantia*, 76(2):220–228.
2. Ashkenazi, V, Chani, E, Lavi, U, Levy, D, Hillel, J, Eeilleux, R.E. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 44:50–62
3. Aziz, S., Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Tomlekova, N. 2022. Assessing polymorphism within common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mutant lines originated from variety “Mastilen 11b” using Inter Simple Sequence Repeats markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 28(4):709–716.
4. Córdoba, J.M., Chavarro, C., Rojas, F., Muñoz, C., Blair, M.W.2010. Identification and Mapping of Simple Sequence Repeat Markers from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Bacterial Artificial Chromosome End Sequences for Genome Characterization and Genetic-Physical Map Integration. *The Plant Genome*, 3(3): 154–165.
5. Gaitan - Solis, E., Duque, M.C., Edwards, K.J., Tohme, J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross - species amplification in *Phaseolus* sap. *Crop Science*, 42: 2128 - 2136.
6. García-Martínez, S., Andreani, L., Garcia-Gusano, M., Geuna, F. 2006. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: Utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome* 49 (6):648–56.
7. Gharsallah, C., Ben Abdelkrim, A., Fakhfakh, H., Salhi-Hannachi, A., Gorsane, F. 2016. SSR marker-assisted screening of commercial tomato genotypes under salt stress. *Breeding Science*, 66(5): 823–830.
8. Ghislain, M, Spooner, D, Rodriguez, F., Villamon, F., Nunez, J., Vasquez, C., Waugh, R., Bonierbale, M. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping

- of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 881–890.
9. Grisi, M.C.M., Blair, M.W., Gepts, P., Brondani, C., Pereira, P.A.A., Brondadi, R.P.V. 2007. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genetic Molecular Resources*, 3: 691 – 706.
 10. Hanai, L.R., Santini, L., Camargo, L.E.A., Fungaro, M.H.P., Gepts, P., Tsai, S.M., Vieira, M.L.C. 2010. Extension of the core map of common bean with EST - SSR, RGA, AFLP and putative functional markers. *Molecular Breeding*, 25 (1): 25–45.
 11. He, C., Poysa, V., Yu, K. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 363-373.
 12. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
 13. Popescu, C.F., Badulesco, A., Manolescu, A.E., Dumitru, A.M., Sumedrea, D.I. 2022. Morphological characterization and genetic variability assessment with SSR markers in several tomato genotypes. *Scientific Papers. Series B, Horticulture. Vol. LXVI (1)*, 513 – 519.
 14. Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J.S., 1998. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science* 3: 195–199.
 15. Seibt, K.M., Wenke, T., Wollrab, C., Junghans, H., Muders, K., Dehmer, K., Diekmann, K., Schmidt, T. 2012. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. *Theoretical and applied genetics*, 125 (1): 185–196.
 16. Seibt, K., Wenke, T., Muders, K., Truberg, B., Schmidt, T. 2016. Short interspersed nuclear elements (SINEs) are abundant in Solanaceae and have a family-specific impact on gene structure and genome organization. *The Plant Journal*, 86 (3): 268–285.
 17. Sharifova, S.S., Mehdiyeva, S.P., Abbasov, M.A. 2017. Analysis of genetic diversity among different tomato genotypes using ISSR DNA markers. *Genetika*, 49 (1): 31– 42.

18. Smulders, M. J. M., Bredemeijer G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 264–272.
19. Tiwari, J.K., Ali, N., Devi,S., Kumar,V., Zinta, R., Chakrabarti, S.K. 2018. Development of microsatellite markers set for identification of Indian potato varieties. *Scientia Horticulturae*, 231:22–30.
20. Tillault, A.S., Yevtushenko, D.P. 2019. Simple sequence repeat analysis of new potato varieties developed in Alberta, Canada. *Plant Direct*, 3(6): 1–10. e00140.
21. Todorovska, E., Ivanova, A., Ganeva, D., Pevicharova, G., Molle, E., Bojinov, B., Radkova, M., Danailov, Zh. 2014. Assessment of genetic variation in Bulgarian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes, using fluorescent SSR genotyping platform, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28 (1):68–76.
22. Tomlekova, N., Yancheva, S., Balacheva, E., Atanasova, B. 2012. Molecular identification of tomato mutant lines. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 6 (1):58–64.
23. Tomlekova, N., Spasova- Apostolova, V., Nacheva, E., Stoyanova, M., Teneva, A., Petrov, N., Schmidt, T. 2017. Genotyping of Bulgarian potato varieties by SINE-based ISAP markers. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 70: 61-70.
24. Tsonev, S., Todorova, V., Grozeva, S., Popova, T., Todorovska, E. 2017. Evaluation of diversity in Bulgarian pepper cultivars by agronomical traits and ISSR markers. *Genetika*, 49 (2): 647–662.
25. Vargas, J.E.E., Aguirre, N.C., Coronado, Y.M. 2020. Study of the genetic diversity of tomato (*Solanum* spp.) with ISSR markers. *Crop Production. Rev. Ceres*, 67 (3).
26. Yu, K., Park, S.J., Poysa, V., Gepts, P. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heredity*, 91: 429 - 434.

БЛАГОДАРНОСТИ:

На първо място изказвам най-искрените си благодарности на
научните ми ръководители –

проф. д-р Теодора Стайкова, която повярва в мен и ме
подкрепи още от студентските ми години,

проф. д-р Нася Томлева, която ме посрещна с надежда и ми
даде възможност да се потопя в съвременната наука.

Благодаря ви за гласуваното ми доверие, предоставената
възможност, вдъхновяващият пример и непрекъснатата
подкрепа, както в личен, така и в професионален план!

Сърдечни благодарности на преподавателския колектив на
Биологически факултет, който ми дадоха основата, с която да

начертая този път. Благодаря на колегите от катедра
„Биология на развитието”, както и от ИЗК „Марица” за
безрезервната подкрепа по този стръмен път!

От всеки научих по нещо!

Не на последно място по важност, благодаря на моето
семейство, който ме научиха, че „човек получава толкова,
колкото дава” и успехите се постигат с много труд!

Благодаря ви, че ме подкрепяте във всички мои начинания!

Посвещавам този труд на **ЧОВЕКА**, който от малка възраст
внедри в мен мисленето, че инвестицията в образованието е
най-ценната!

Моят покрен дядо - Шефкет Азиз!

