

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**

Марияна Стамова Георгиева

**Молекулярно-цитогенетична
характеристика на геномния интегритет при
ечемика**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
“Доктор”

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

Научни консултанти:
проф. д-р Любомир Стоилов
доц. д-р Димитър Василев

Рецензенти:
акад. Атанас Атанасов
доц. д-р Габриеле Йовчев

София
2014 г.

Дисертацията е написана на 157 страници и включва 60 фигури, 5 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 322 литературни източника, всички на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения Научен съвет на секция „Молекулярна генетика” към Института по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 23/10/2013.г.

Докторантката към момента е асистент в секция „Молекулярна генетика” към Института по физиология на растенията и генетика” – БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на жури, избрано от Научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика – БАН с Протокол №10/30.10.2013 и утвърдено със Заповед 948/05.11.2013 г. на Директора на Института по физиология на растенията и генетика – БАН.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Любомир Стоилов (научен консултант)

Доц. д-р Румяна Василевска-Иванова

Външни членове:

Акад. Атанас Атанасов

Доц. д-р Габриеле Йовчев

Доц. д-р Георги Милошев

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика - БАН, бл. 21, ет. 2, ст. 225. и на Web- страницата на Института по физиология на растенията и генетика – БАН

Авторефератът е отпечатан с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0025, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007–2013) и съфинансиран от Министерството на образованието и науката в Република България.

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**

Марияна Стамова Георгиева

**Молекулярно-цитогенетична характеристика на
геномния интегритет при ечемика**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
“Доктор”

Професионално направление: **4.3. „Биологични науки“**

По научна специалност: шифър **01.06.06. „Генетика“**

Научни консултанти:

проф. д-р Любомир Стоилов

доц. д-р Димитър Василев

Рецензенти:

акад. Атанас Атанасов

доц. д-р Габриеле Йовчев

София

2014 г.

	стр
СЪДЪРЖАНИЕ	i
БЛАГОДАРНОСТИ	1
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	2
I. УВОД	3
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	3
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	4
III. 1. Експериментален материал	4
III. 1. 1. Растителен материал.....	4
III. 1. 2. ДНК проби, използвани в хибридизационните анализи.....	5
III. 2. Методи	5
III. 2. 1. Подготовка на препарати с метафазни хромозоми.....	5
III. 2. 2. Изолиране и пречистване на геномна ДНК.....	5
III. 2. 3. Определяне концентрацията на ДНК.....	6
III. 2. 4. Белязване на ДНК-пробите с digoxigenin и biotin чрез ник- трансляция.....	6
III. 2. 5. Флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизация (FISH).....	6
III. 2. 6. Анализ на изображенията.....	6
III. 2. 7. Третиране с блеомицин (БЛМ).....	6
III. 2. 8. Облъчване с литиеви йони ^7Li	6
III. 2. 9. Облъчване с гама радиация.....	7
III. 2. 10. Тест за жизнеспособност и кинетика на прорастване на семената.....	7
III. 2. 11. Електрофореза на единични ядра (кометен анализ).....	7
III. 2. 11. 1. Изолиране на ядра.....	7
III. 2. 11. 2. Подготовка на препаратите за кометен анализ.....	7
III. 2. 11. 3. Неутрален протокол на кометния анализ.....	7
III. 2. 11. 4. Алкален протокол на кометния анализ.....	7
III. 2. 11. 5. Анализиране на кометите.....	7
III. 3. Експериментален дизайн	7
IV. 3. 1. Експериментален дизайн на експериментите с БЛМ.....	7
IV. 3. 2. Експериментален дизайн на радиационните експерименти.....	7
III. 4. Статистически анализ на резултатите	7
III. 4. 1. Основни статистически подходи при кометния анализ.....	7

III. 4. 2. Алтернативни подходи за представяне на резултатите.....	8
III. 4. 2. 1 Описателна статистика.....	8
III. 4. 3. Параметричен и непараметричен анализ.....	8
III. 4. 3. 1. Дизайн на статистическия анализ.....	8
III. 4. 3. 2. Дисперсионен анализ.....	8
III. 4. 3. 3. Тест на Крускал - Уолис.....	8
III. 4. 4. Анализ на статистическото разпределение.....	8
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	8
IV. 1. Молекулярно-цитогенетична характеристика на стандартния кариотип Freya и реконструираният лини ечемик- T-1586, D-29/46, T-21, РК 88-19 и РК 180-19 чрез флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизация (FISH).....	8
IV. 1. 1. Физическа организация на стандартен кариотип Freya.....	8
IV. 1. 1. 1. Индивидуална характеристика на ечемичните хромозоми.....	9
IV. 1. 1. 1. 1. <i>Характеристика на хромозома 1H</i>	9
IV. 1. 1. 1. 2. <i>Характеристика на хромозома 2H</i>	10
IV. 1. 1. 1. 3. <i>Характеристика на хромозома 3H</i>	10
IV. 1. 1. 1. 4. <i>Характеристика на хромозома 4H</i>	10
IV. 1. 1. 1. 5. <i>Характеристика на хромозома 5H</i>	12
IV. 1. 1. 1. 6. <i>Характеристика на хромозома 6H</i>	12
IV. 1. 1. 1. 7. <i>Характеристика на хромозома 7H</i>	12
IV. 1. 1. 2. Общ преглед на профила на получените сигнали при стандартния кариотип Freya.....	13
IV. 1. 1. 3. Анализ на локализацията на рибозомните РНК гени. Нови допълнителни хомоложни локуси на рибозомалните гени, установени в стандартния кариотип Freya.....	14
IV. 1. 2. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип T-1586. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH.....	15
IV. 1. 2. 1. <i>Характеристика на реконструирани хромозоми 3H^{4H} и 4H^{3H}</i>	15
IV. 1. 3. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип T-21. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH.....	16
IV. 1. 3. 1. <i>Характеристика на реконструирани хромозоми 5H^{6H} и 6H^{5H}</i>	16
IV. 1. 4. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип D-29/46. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH.....	17

IV. 1. 4. 1. Характеристика на реконструирани хромозоми $4H^{6H}$ и $6H^{4H}$	17
IV. 1. 5. Анализ на наблюдаваните хибридизационни сигнали в мултиреконструиран кариотип РК 88-19. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH.....	19
IV. 1. 5. 1. Характеристика на реконструирани хромозоми $1H^{5H}$ и $5H^{1H}$	19
IV. 1. 5. 2. Характеристика на реконструирани хромозоми $2H^{7H}$ и $7H^{2H}$	19
IV. 1. 5. 3. Характеристика на реконструирани хромозоми $3H^{4H}$ и $4H^{3H}$	21
IV. 1. 5. 4. Характеристика на реконструирана хромозома $6Hi$	21
IV. 1. 6. Анализ на наблюдаваните сигнали в мултиреконструиран кариотип РК 180-19. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH.....	21
IV. 1. 6. 1. Характеристика на реконструирана хромозома $2Hi$	23
IV. 1. 6. 2. Характеристика на реконструирана хромозома $5Hi$	23
IV. 2. Оценка на ДНК скъсвания в генома на ечемика, индуцирани чрез радиомиметика БЛМ и чрез радиация с висок (7Li - йони) и с нисък (гама лъчи) ЛПЕ, посредством кометен анализ. Анализ на способността за възстановяване на повредите.....	23
IV. 2. 1. Фенотипна характеристика на реконструирани кариотипи Т-1586 и D-29/46.....	23
IV. 2. 2. Разработване и оптимизиране на кометния анализ при растителни тест системи като тест за анализ на скъсвания в ДНК след радиационни въздействия.....	24
IV. 2. 3. Изследване ефекта от третиране с 7Li -йони и гама радиация върху покълването на семената и преживяемостта	24
IV. 2. 4. Оценка на индуцираните чрез радиационни лъчения с висок (7Li -йони) и нисък (гама лъчи) ЛПЕ скъсвания на ДНК в генома на ечемика, с помощта на алкален кометен анализ	25
IV. 2. 5. Оценка на индуцираните чрез радиационни лъчения с висок (7Li -йони) и нисък (гама лъчи) ЛПЕ скъсвания на ДНК в генома на ечемика, с помощта на неутрален кометен анализ. Анализ на способността за възстановяване на повредите.....	26
IV. 2. 6. Анализ на кинетиката на репарация на индуцирани повреди след прилагане на 100Gy гама лъчи върху ядра от реконструирани кариотипи Т-1586 и D-29/46 чрез неутрален вариант на кометния анализ.....	28

IV. 3. Оценка на индукцията и кинетиката на репарация на предизвиканите от БЛМ скъсвания в генома на ечемика чрез неутрален кометен анализ.....	29
IV. 3. 1. Индукция на ДВС след третиране с БЛМ.....	29
IV. 3. 2. Репарационна кинетика на ДВС, получени след третиране с БЛМ.....	30
IV. 3. 3. Индукция и репарация на ЕВС, получени след третиране с БЛМ	31
IV. 4. Статистически подходи за анализ на данните - описателна статистика, оценка на варирането, избор на разпределение, параметрични и непараметрични статистически тестове	32
IV. 4. 1. Обобщени линейни модели	34
Акценти от глава IV. 1.....	36
Акценти от глави IV. 2. и IV. 3.....	36
Акценти от глава IV. 4.....	37
V. ИЗВОДИ.....	39
VI. ПРИНОСИ.....	40
VII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА.....	40
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	42
VIII. 1. Научни публикации в пълен текст.....	42
VIII. 2. Постери и доклади, представени на научни форуми.....	42
VIII. 3. Забелязани цитати.....	43

*Издавам искрената си благодарност на научните си консултанти **проф. д-р Любомир Стоилов и доц. д-р Димитър Василев** за изключително компетентните предложения, критичните бележки и напътствия по време на разработването на дисертационния ми труд.*

*Искрено благодаря на **проф. д-р Костадин Гечев** за предоставения експериментален материал, както и за неговите ценни съвети и професионално съдействие.*

*Дължа специална благодарност на **гл. ас д-р Анна Димитрова** за незаменния ѝ принос, искрената ѝ доброжелателност, за помощта, която ми оказа през целия процес на изработване и написване на дисертацията.*

*С лична благодарност се обръщам към **д-р Марта Молнар-Ланг** и унгарските ми колеги за предоставената възможност за ценна и ползотворна работа в тяхната лаборатория (Agricultural Institute, секция Plant Genetic Resources and Organic Breeding, Мартонвашар, Унгария), за съдействието им при провеждане на молекулярно-цитогенетичните експерименти.*

*Съществено значение за подготовката на дисертацията имаше създадената приятелска атмосфера, проявена съпричастност и помощ от **колегите от секция “Молекулярна генетика”**, които допринесоха за подобряване на качеството на дисертационния ми труд.*

Работата по дисертацията беше осъществена предимно чрез участието ми в работните екипи по проекти BUL 12608/2003 с МAAE – Виена , Г14-01-01/2004 по програма Геномика към НФНИ – МОН, Б 1529/2005 към НФНИ – МОН, BUL 15481 с МAAE – Виена, AGRISAFE на Европейския съюз, като благодаря за тяхната финансова и научно-образователната подкрепа.

Тази работа е осъществена с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0025, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007–2013) и съфинансирана от Министерството на образованието и науката в Република България.

Искам да изкажа специална благодарност на моите родители, моят брат и моите близки приятели за проявеното търпение през годините, давайки ми сила, опора и увереност, и без които никога не бих се справила.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Кирилица

БЛМ - блеомицин

ДВС - двойноверижни скъсвания

ЕВС - едноверижни скъсвания

ЙР - йонизираща радиация

кб - килобази

ЛПЕ - линеен пренос на енергия

НОР – нуклеолусен (ядърцев) организатор

НХВК - нехомоложно възсъединяване на краищата

ОЛМ - обобщени линейни модели

рДНК – рибозомна ДНК

рРНК – рибозомна РНК

Латиница

FISH - флуоресцентна *in situ* хибридизация (Fluorescence *In Situ* Hybridization)

FL -Fraction Length

mG – милигеноми

I. УВОД

Геномът на растенията, като основен компонент на живи системи с неподвижен начин на съществуване, е подложен на непрекъснатото въздействие на различни фактори от околната среда, в това число и на различни типове радиационни въздействия. Въздействайки върху естествения статус на заложената генетична информация, те повлияват на неговия интегритет и геномна стабилност. Способността за поддържане на геномния интегритет и едновременно с това осигуряване на неговата пластичност, са основните фактори за еволюционното развитие и преживяемост на всеки вид. За да се гарантира висококачествен пренос на генетична информация, клетките са развили механизми, които им служат като монитор за наблюдение на интегритета на генома. Един от най-важните аспекти за поддържане на геномната цялост е прецизната регулация на индуцираните и конститутивни механизмите на репарация на ДНК, отговорни за поддържане на интактната геномна организация при висшите растения.

Счита се, че висшите растения са по-толерантни към облъчване с йонизиращи лъчения, отколкото клетките на бозайниците, което вероятно се дължи на липсата на p53-зависим апоптотичен отговор към индукцията на двойноверижни скъсвания (ДВС), независимо от факта, че съществува механизъм за спиране на клетъчния цикъл и при растенията. Очакваният положителен или отрицателен ефект от дадено въздействие зависи от капацитета на таргетния геном и неговата чувствителност в зависимост от типа на индуцираните първични повреди в ДНК.

Резултатите, които са представени в настоящия труд, са показателни за съществуването на различия в чувствителността на генома, и типа на индуцираните преустройства в зависимост от природата на йонизиращата радиация (ЙР). Проведените анализи показват, че рекомбинационните механизми на възстановяване силно се повлияват, както от типа на първично възникналите повреди в ДНК, така и от генома на съответния реконструиран кариотип.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва влиянието на радиационно-индуцирани повреди върху структурната организация и интегритета на генома при реконструирани кариотипи ечемик.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните конкретни експериментални задачи:

1. Локализиране на местата на радиационно-индуцираните транслокационни и инверсионни скъсвания при реконструирани кариотипи ечемик посредством флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) с повторени ДНК последователности.
2. Адаптиране на техниката за неутрална и алкална електрофореза на единични ядра (кометен анализ) като подходяща методология за оценка на индукцията и ранните етапи от репарацията на ДНК-скъсванията в генома на ечемика.
3. Приложение на неутралния и алкалния вариант на кометния анализ за оценка на първичната индукция и репарацията на едно- и двойноверижните ДНК скъсвания:
 - предизвикани след облъчване с йонизираща радиация с висок (^7Li -йони) и нисък (гама лъчи) линеен пренос на енергия (ЛПЕ) на кариотипи ечемик с подходяща хромозомна конституция.
 - индуцирани в генома на ечемика след третиране на коренови прорастъци с радиомиметичния агент блеомицин.
4. Оптимизиране на методите за статистическа обработка на получените резултати от кометния анализ.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

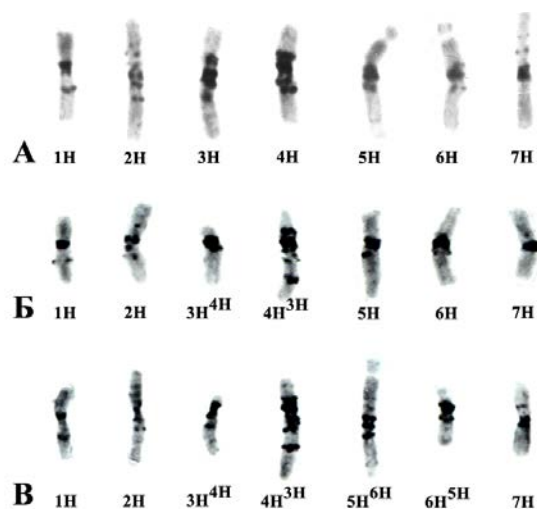
III. 1. Експериментален материал

III. 1. 1. Растителен материал

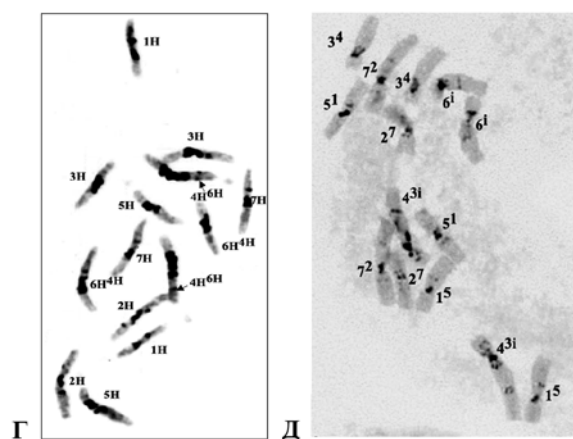
В изследванията са използвани линии ечемик от създадената в бившия Институт по генетика колекция от структурни мутанти, получени чрез облъчване с γ -лъчи (дозы между 100Gy и 200Gy) на сухи семена от стандартния кариотип двуреден пролетен ечемик сорт Freya и по-нататъшната насочена комбинативна селекция на кариотипи с подходяща хромозомна реконструкция. В анализите са използвани следните линии ечемик - T-1586, D-29/46, T-21, PK 88-19 и PK 180-19, а за контрола - родителският сорт Freya.

В зависимост от характера на хромозомната реконструкция, тези линии се разделят в три групи: транслокационни линии (T-1586 и T-21), дупликационна линия (D-29/46) и мултиреконструирани кариотипи (PK 88-19 и PK 180-19). Профилът на Гимза N-

оцветяването на някои от посочените кариотипи, представящ разпределението на хетерохроматиновите участъци в хромозомите, е представен на фиг. 1.



Фиг. 1. Профили на разпределение на хетерохроматиновите участъци при ечемика, получени след прилагане на Гимза N-оцветяване: (А) Стандартен кариотип Freya; (Б) Транслокационна линия T-1586; (В) Транслокационна линия T-21; (Г) Дупликационна линия D-29/46; (Д) Мултиреконструирана линия PK 88-19 (по Gecheff 1978; 1989; Gecheff et al., 1996; 2003; 2008).



III. 1. 2. ДНК проби, използвани в хибридизационните анализи

При провеждане на FISH анализите бяха използвани следните ДНК сонди:

1 Клон pTa71, съдържащ EcoRI фрагмент на 18S - 5.8S - 26S рибозомна ДНК (рДНК) транскрипционната единица (10 килобази (кб)), изолирана от пшеница (*Triticum aestivum* L.) (Gerlach and Bedbrook, 1979).

2. Клон pAs1 представлява първия субфамилен клон на тандемно повторените секвенции на Afa-family (Nagaki et al., 1995), съдържащ повторена ДНК последователност с дължина 1кб, изолиран от *Aegilops squarrosa* (Rayburn and Gill, 1986).

3. Микросателитната ДНК последователност GAA (Pedersen et al., 1996) е амплифицирана от геномна ДНК на ечемик.

4. Клон HvT01 представлява субтеломерна тандемно повторена последователност, изолирана от ечемик (Belostotsky and Ananiev, 1990).

III. 2. Методи

III. 2. 1. Подготовка на препарати с метафазни хромозомы

III. 2. 2. Изолиране и пречистване на геномна ДНК

За изолиране на геномна ДНК от ечемик, пшеница и *Aegilops* е използвана стандартна фенол/хлороформ екстракция, съгласно протокола на Sharp et al. (1988).

III. 2. 3. Определяне концентрацията на ДНК

Количеството и чистотата на изолираната ДНК са определени спектрофотометрично с помощта на NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

III. 2. 4. Белязване на ДНК-пробите с digoxigenin и biotin чрез ник - трансляция

Клон pTa71, клон pAs1, микросателитната ДНК последователност GAA и клон HvT01 са белязани чрез ник-транслация (Roche, Mannheim, Germany) с digoxigenin-16-dUTP и/или с biotin-11-dUTP, при условия, препоръчани в инструкциите на производителя.

III. 2. 5. Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)

Хибридизацията и визуализацията на сигналите са проведени съгласно протокола на Molnár-Lang et al. (2000).

След детекция на хибридизационния сигнал, белязаните с digoxigenin-16-dUTP проби генерират зелен цвят, а белязаните с biotin-11-dUTP - червен цвят. Смесването на двете белязани проби продуцира жълт цвят върху хромозомите.

III. 2. 6. Анализ на изображенията

Визуализацията на хромозомните препарати е извършена чрез Zeiss Axioscope 2 епифлуоресцентен микроскоп.

Профилът на разпределение на хибридизационните сигнали е съставен чрез подразделяне на целия ечемичен геном на 1000 единици или милигеноми (mG) (Künzel et al., 2000). Локализирането на хибридизационните сигнали, както и на хромозомните участъци с възникнали преустройства, е съобразено с публикувания профил на нормалния кариотип на ечемика като е преизчислен, съобразно стойностите, получени чрез FISH техниката. Сигналите, представени върху идиограмите се наблюдават в 98% от анализирания хромозоми.

III. 2. 7. Третиране с блеомицин (БЛМ)

Третирането с БЛМ (50, 100, 150 и 200 µg/ml) се извършва на тъмно при температура 37°C за 2 часа. Част от третираните с БЛМ ядра бяха инкубирани за възстановяване в термостат при 25°C, на тъмно при репаративни интервали от 15, 30 и 60 мин.

III. 2. 8. Облъчване с литиеви йони -⁷Li

Суши семена от ечемик бяха облъчени с ^7Li -йони. Енергията на приложеното лъчение е 42.3MeV като бяха използвани две дози съответно - 55Gy и 110Gy (при мощност на дозата 8Gy/мин).

III. 2. 9. Облъчване с гама радиация

Гама източник Цезий-137 (GOU-3M), излъчващ гама лъчи с доза от 146Gy/час, е използван за облъчване на сухи семена и коренови прорастъци от ечемик, с дози 55Gy и 110Gy, използвани като референтни.

III. 2. 10. Тест за жизнеспособност и кинетика на прорастване на семената

За определяне на кинетиката на прорастране на семената от две линии ечемик Т-1586 и D-29/46 беше проследен броя на покълналите семена на 24^{-ия} час и на 72^{-ия} час като се отчита поява на 1 мм колеориза. Семената са облъчени с 55Gy и 110Gy гама лъчи.

III. 2.11. Електрофореза на единични ядра (кометен анализ)

III. 2. 11. 1. Изолиране на ядра

За изолиране на ядра от коренови прорастъци от ечемик е използвана процедурата на Van't Hoff's (1975) с малки изменения.

III. 2. 11. 2. Подготовка на препаратите за кометен анализ

III. 2. 11. 3. Неутрален протокол на кометния анализ

Използвания в дисертационния труд протокол се базира на няколко публикувани преди това протокола на неутралния вариант на кометния анализ при растенията (Korpen and Cerda, 1997; Korpen and Angelis, 1998; Korpen et al., 1999).

III. 2. 11. 4. Алкален протокол на кометния анализ

Използваната в дисертацията алкална процедура на комения анализ се базира на общоприетите протоколи при растенията (Korpen and Verschaeve, 1996, 2001; Gichner et al., 1999), но при по-слабо алкални условия за електрофореза- рН 12.6.

III. 2. 11. 5. Анализиране на кометите

III. 3. Експериментален дизайн

III. 3. 1. Експериментален дизайн на експериментите с БЛМ

III. 3. 2. Експериментален дизайн на радиационните експерименти

III. 4. Статистически анализ на резултатите

III. 4. 1. Основни статистически подходи при коментия анализ

Всички статистически анализи на експерименталните данни и графичното представяне на резултатите е извършено с помощта на софтуерен пакет SPSS v. 15.0.

Основният метод за анализ, който е приложен за експериментите с БЛМ, ^7Li - йони и гама радиация е на базата на т.нар. Обобщени Линеини Модели (ОЛМ) (Lovell et al., 1999) като подходящ за посочения експериментален дизайн.

Използваният модел е, както следва:

$$y=(\eta)Xb+ \varepsilon,$$

където y е векторът на наблюдавания параметър (% ДНК в опашката), η е свързващата функция, X е моделна матрица на наблюденията, b е вектор на фиксираните ефекти (концентрацията/дозата и времето за възстановяване), и ε е вектора на случайните неотчетени грешки.

Всички различия, при които се отхвърля нулевата хипотеза, са обсъждат само при статистическа достоверност до $P<0.05$.

III. 4. 2. Алтернативни подходи за представяне на резултатите

III. 4. 2. 1 Описателна статистика

III. 4. 3. Параметричен и непараметричен анализ

III. 4. 3. 1. Дизайн на статистическия анализ

III. 4. 3. 2. Дисперсионен анализ

III. 4. 3. 3. Тест на Крускал - Уолис

III. 4. 4. Анализ на статистическото разпределение

Изследването се базира на анализ на най-типичното статистическо разпределение на стойностите на параметъра, получен при изчисляване на кометите. За оценката на разнообразието от разпределения е проведен тест за качество на приближението („Goodness of fit”) въз основа на непараметричния критерий на Колмогоров - Смирнов и параметричния критерий χ^2 („хи квадрат”).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV. 1. Молекулярно-цитогенетична характеристика на стандартния кариотип Freya и реконструираният лини ечемик- T-1586, D-29/46, T-21, РК 88-19 и РК 180-19 чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)

В настоящото изследване е приложена FISH техниката за определяне на физическата организация на стандартния кариотип на ечемика Freya и реконструираният лини T-1586, D-29/46, T-21, РК 88-19 и РК 180-19.

IV. 1. 1. Физическа организация на стандартния кариотип Freya

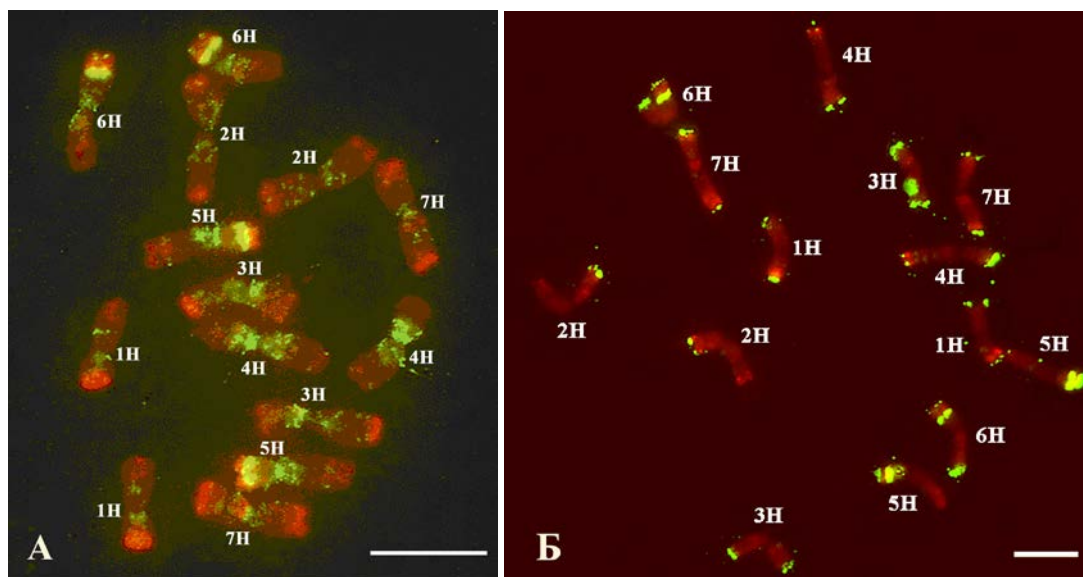
Стандартният кариотип Freya е анализиран с помощта на FISH чрез използването на четири повторени последователности – GAA, Afa family, pTa71 и HvT01 (фиг. 2 А; Б). Разположението и броят на сигналите, генерирани от три от използваните проби (GAA, Afa family, pTa71), бяха сравнени със сигнали в публикувани идиограми при ечемика, представящи профила на посочените проби в ечемични хромозоми. (Pedersen et al., 1996; Tsujimoto et al., 1997; Pedersen и Linde-Laursen, 1994).

IV. 1. 1. 1. Индивидуална характеристика на ечемичните хромозоми

IV. 1. 1. 1. 1. Характеристика на хромозома 1Н

Пробата GAA хибридизира основно в перичентромерните участъци и в средата на дългото рамо на 1Н хромозома (фиг. 2А). Профилът на тази проба съответства на посочения преди това от Pedersen et al. (1996), с изключение на един сигнал в дългото рамо (определен на позиция FL 86 (англ. Fraction Length), който е наличен при сорт Emir и липсва при Freya.

Пробата Afa family хибридизира с ДНК последователности, близо до субтеломерната област в късото рамо на хромозомата. Освен тях, се наблюдават два малки сигнала в дългото рамо. Сравнителният анализ на сигналите при Freya показва, че те съвпадат с тези наблюдавани при сорт Betzes. Тяхната позиция е измерена в милигеноми и е представена в идиограмата (фиг. 3).



Фиг. 2. FISH на стандартен кариотип Freya. Локализация на повторените последователности: (А) GAA (зелен сигнал), Afa family (червен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). (Б) Afa family (червен сигнал), HvT01 (зелен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал).

IV. 1. 1. 1. 2. Характеристика на хромозома 2H

Освен перичентромерните GAA сигнали, в тази хромозома при Freya се наблюдават още пет сигнала. Два от тях са в късото рамо, а останалите три са позиционирани в дългото рамо. В дългото рамо, на анализирания от нас стандартен кариотип на ечемика- Freya, на разстояние от центромерата 59mG (фиг. 2), има ясен GAA сигнал. На тази позиция липсва сигнал от профила, получен след прилагане на N-бендинга (фиг. 1).

Сигналите от Afa family пробата също са пет, като три от тях са характерни за субтеломерните участъци - съответно един силен блоков сигнал на късото рамо и два по-слаби на позиция 69mG и 80mG от центромерата на дългото рамо. Със значително по-нисък интензитет са наблюдаваните два сигнала от тази проба на позиция 18mG и 39mG в късото рамо на 2H хромозома. Тяхната позиция е представена в идиограмата на фиг. 3.

IV. 1. 1. 1. 3. Характеристика на хромозома 3H

Освен сигналите от GAA пробата в перичентромерния участък на 3H хромозома, наблюдавахме още пет сигнала от тази проба, два, от които са в късото рамо на позиция 17mG и 28mG. Останалите три сигнала от тази проба са в дългото рамо и са видими на позиции 28mG, 47mG и 61mG. (фиг. 3).

Освен крайните блокови сигнали от Afa family пробата, 3H хромозома е наситена с малки хибридационни участъци от тази проба. В късото рамо на 3H хромозома са установени четири сигнала, разпръснати на разстояние от по 10mG. В дългото рамо се наблюдават два сигнала от тази проба, съответно на позиция 8mG и 12mG от центромерата. Всички посочени сигнали, получени при нашите експерименти, и тези посочени в литературата, характерни за ечемика, съвпадат. Изключение прави терминалния Afa family сигнал в дългото рамо при Freya, който е един, докато при сорт Emir на същата позиция са отдиференцирани два (Tsujimoto et al., 1997).

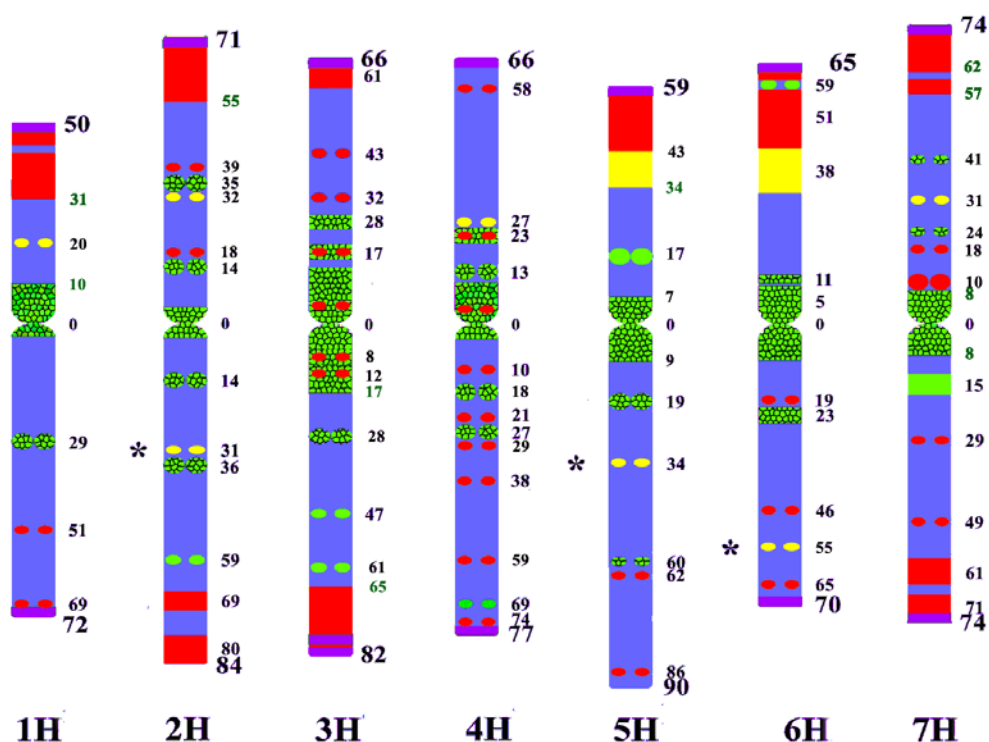
В субтеломерните области на късото рамо на 3H хромозома има един сигнал от проба HvT01, докато в дългото рамо се наблюдават два хибридационни сайта на тази проба. Това е предпоставка за лесното разпознаване на тази хромозома при използването на проба HvT01.

Пробата pTa71 не хибридира с тази хромозома.

IV. 1. 1. 1. 4. Характеристика на хромозома 4H

4H хромозома е лесно различима на фона на останалите поради изключителната си наситеност с пробата GAA в перичентромерната област (фиг. 2A). Освен тези сигнали, в късото рамо на разстояние 13mG и 23mG, също се наблюдават GAA сигнали. В дългото

рамо тази проба хибридизира на разстояние 18mG, 27mG и 69mG от центромерата. При сравняване на профила, който наблюдаваме при Freya с профила от тази проба в други сортове ечемик наблюдавахме различия, отнасящи се до три малки сигнала (FL 24 и FL 72) в късото рамо и един (FL 23) в дългото рамо (Pedersen et al., 1996), които не са характерни за изследвания от нас кариотип, представен на фиг. 2. При Freya има един допълнителен сигнал от тази проба в дългото рамо на позиция 69mG от центромерата, който липсва като сигнал при N бендинга (фиг. 1).



Фиг. 3. Локализация на повторените последователности в метафазни хромозоми от стандартния кариотип Freya на ечемика. Схематично са представени позициите на сигналите GAA (зелен цвят), pTa71 (жълт цвят), HvT01 (лилав цвят) и Afa family (червен цвят) и N бендовете в хромозомите на ечемика. Съвпадащите сигнали от GAA сондата и N бендинга са отбелязани в зелен цвят и шриховани. Сигналите, характерни само за GAA пробата, са оцветени само в зелено. Означените в зелено милигеноми отразяват края на съответния сигнал.

Afa family сигналите в хромозома 4H са разпръснати по цялата хромозома. Три от тях са в късото рамо, а останалите шест, в дългото рамо.

4Н хромозома има по един сигнал от проба НvT01 в субтеломерните области и на двете си рамена.

рТа71 пробата има един хибридизационен сайт в късото рамо, намиращ се на разстояние 27mG от центромерата.

IV. 1. 1. 1. 5. Характеристика на хромозома 5Н

В 5Н хромозома се визуализират хибридизационни сайтове от GAA пробата в перицентромерните участъци, както и един в късото рамо на разстояние 17mG и два допълнителни в дългото рамо в позиции 19mG и 60mG (фиг. 2). Установеният сигнал в късото рамо на разстояние 17mG от центромерата отсъства при N-бендинга (фиг. 1).

Afa сигналите са общо три - един блоков, характерен за сателита и два малки, слабо изразени и идентифицирани в дългото рамо на разстояние 62mG и 86mG.

В субтеломерните области на късото рамо на 5Н хромозома има един сигнал от проба НvT01, докато в дългото рамо не се наблюдават сигнали от тази проба.

рТа71 пробата хибридизира с тази хромозома и дава много ясен сигнал в областта на нуклеолусния (ядърцев) организатор (НОР)-а.

IV. 1. 1. 1. 6. Характеристика на хромозома 6Н

Пробата GAA хибридизира в перицентромерната област, в сателита на разстояние 59mG от центромерата и на разстояние 23mG в дългото рамо (фиг. 2). Сигналят от GAA пробата в областта на сателита е характерен само за Freya и видим само чрез FISH анализа.

Пробата Afa family показва общо пет сигнала. Единствено Afa family сигнал в дългото рамо (46mG) не е характерен за сорт Betzes (Tsujimoto et al., 1997).

Пробата НvT01 хибридизира в субтеломерните области и на двете рамена на хромозомата.

Пробата рТа71 хибридизира с тази хромозома и дава много ясен сигнал в областта на НОРа. Този сигнал е с по-нисък интензитет от наблюдавания в аналогичния район на 5Н хромозомата.

IV. 1. 1. 1. 7. Характеристика на хромозома 7Н

Пробата GAA хибридизира в перицентромерната област, в късото рамо на разстояние 24mG и 41mG и в дългото рамо на позиция 15mG от центромерата (фиг. 2). Последният сигнал не е наблюдаван нито при останалите ечемични сортове, нито е видим при стандартния кариотип Freya след прилагане на N-бендинг техниката (фиг. 1).

Пробата Afa family хибридизира в четири основни локуса - два в субтеломерните области и два, локализирани перицентромерно (10mG и 18mG), в късото рамо на

хромозомата, точно до сигналите от GAA пробата. Малки хибридизационни сигнали от тази проба бяха наблюдавани и в дългото рамо на позиция 29mG и 49mG от центромерата.

Пробата HvT01 хибридизира в субтеломерните области на двете рамена на хромозома 7H.

Пробата pTa71 има един хибридизационен сайт в късото рамо, намиращ се на разстояние 31mG от центромерата (фиг. 2А; Б).

IV. 1. 1. 2. Общ преглед на профила на получените сигнали при стандартния кариотип Freya

Последователността GAA за пръв път е изолирана от Dennis et al. (1980) и е класифицирана като микросателитна ДНК последователност, която е характерна за хетерохроматиновите участъци на хромозомите при висшите еукариоти. Използването на FISH техниката с помощта на полипуриновия мотив (GAA)₇ или ДНК клонове, богати на GAA повтори, продуцират профил, който е подобен на този, получен при C- и N-бендинга, с изключение на C- негативни и N-позитивните сигнали в центромерните участъци, теломерните сигнали при C-бендинга и HOP-ите (Pedersen and Linde-Laursen, 1994; Pedersen et al., 1996). В дисертационният труд е извършен сравнителен анализ на профила от N-бендинга (фиг. 1) с този, който дава GAA сондата (фиг. 2; 3).

Общият преглед на позицията на сигналите, получени след прилагането на GAA сондата показва, че тази последователност основно хибридизира в центромерните и перичентромерните участъци на хромозомите, като размера и интензитета на тези сигнали са различни. Сравнителният анализ между хибридизационните сигнали от N-бендинга и тези от GAA сондата показват, че FISH анализа е подход с по-висока чувствителност от N-бендинга. Допълнителни сигнали с приблизително еднакъв интензитет от GAA пробата установихме в медиалните части на дългите рамена на хромозомите 2H, 3H, 4H, в перичентромерната област на късото рамо на 5H и в дългото рамо на 7H, както и в субтеломерната област на късото рамо на 6H хромозома (фиг. 1; 2; 3).

Високо повторената Afa family последователност е изолирана за първи път при *Aegilops squarrosa* L. и е описана като високо специфична повторена последователност - pAs1, характерна за D-генома (Rayburn and Gill, 1986). Нашите резултати от FISH анализа с Afa family пробата показват, че сигналите, които тя дава, са разпръснати неравномерно във всички хромозоми на ечемика. Само в някои хромозоми има Afa family сигнали в средните участъци на хромозомните рамена (2H, 4H и 7H) (фиг. 2 А; Б). Следва да се

отбележи, че в стандартния кариотип на ечемика Freya, най-силните блокове от Afa family сигнали са разположени в близост до местата на локализация на рибозомалните гени, в късите рамена на 5Н и 6Н хромозомите (фиг. 2А).

Геномът на ечемика съдържа 118 тандемно повторени базови двойки сателитна ДНК (Belostotsky and Ananiev, 1990), като тези последователности принадлежат към семейството на теломерно-свързаните последователности - HvRT. Прилагането на FISH техниката с помощта на тези субтеломерни последователности (HvT01) показва, че те се идентифицират основно в терминалните участъци на дванадесет ечемични хромозоми (Röder et al., 1993; Szakács and Molnar-Lang, 2006), поради факта, че сигналите в дългите рамена на 2Н и 5Н хромозомите са много малки и не се проявяват при FISH (фиг. 2 Б).

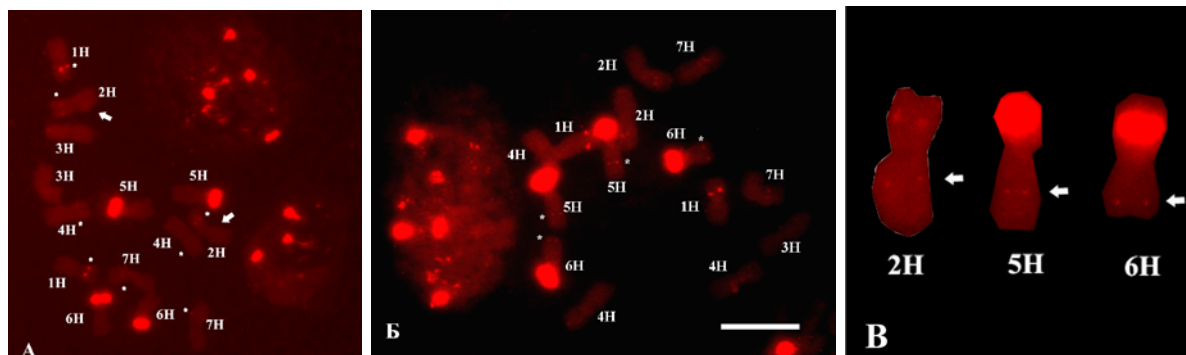
IV. 1. 1. 3. Анализ на локализацията на рибозомните РНК гени. Нови допълнителни хомоложни локуси на рибозомните гени, установени в стандартния кариотип Freya

Рибозомните РНК гени при висшите еукариоти са организирани в две ясно отличими мултигенни семейства. Първият клас е представен от 45S рибозомна ДНК, която съдържа високо консервативните транскрибиращи се субединици за 18S, 5.8S и 25/28S рибозомни РНК (рРНК)-и. Транскрипционните единици са разделени една от друга чрез силно вариабилен междугенен спейсер (Sajdak et al., 1998). Заедно те са представени чрез множество копия и участват във формирането на нуклеолусните организатори. Вторият клас кодира 5S рРНК и съдържа високо консервативна кодираща последователност от 120 базови двойки (Gerlach and Dyer, 1980; Martins et al., 2000).

Клонът pTa71 (18S-5.8S-25S) съдържа кодиращите последователности рДНК (18S-5.8S-25S) и регулаторните участъци (Gerlach and Bedbrook, 1979). Хибридизацията на пшеничната рДНК проба в хромозомите на ечемика дава възможност да бъдат диференцирани ясно двата основни локуса на рибозомните РНК гени, разположени в НОР-и на хромозомите 5Н и 6Н, а също така и четири по-малки рибозомни локуси (18S-25S рДНК) в 1Н, 2Н, 4Н и 7Н хромозомите (фиг. 4).

В нашите изследвания, освен посочените повтори, бяха установени малки повтори, които показваха близка хомология с pTa71 пробата. Те са локализиращи в дългите рамена на 2Н (31mG), 5Н (34mG) и 6Н (55mG) (фиг. 4 А; Б; В). Тези повтори са с ниска честота (под 8%) и са видими само след допълнителна обработка (увеличаване на контраста) на флуоресцентните сигнали. Ниската честота и слабата флуоресценция, дори по-ниска от сигналите от тази проба в късото рамо на 4Н хромозома, ни дава основание да предположим, че тези повтори не представят рДНК гени, а псевдогени с

висока близост до рДНК гените (фиг. 4 В). Друга логична обосновка на тези резултати е степента на чувствителност на приложения метод. Позицията на тези сигнали беше изчислена и представена в идиограмата при сорт Freya (фиг. 3).



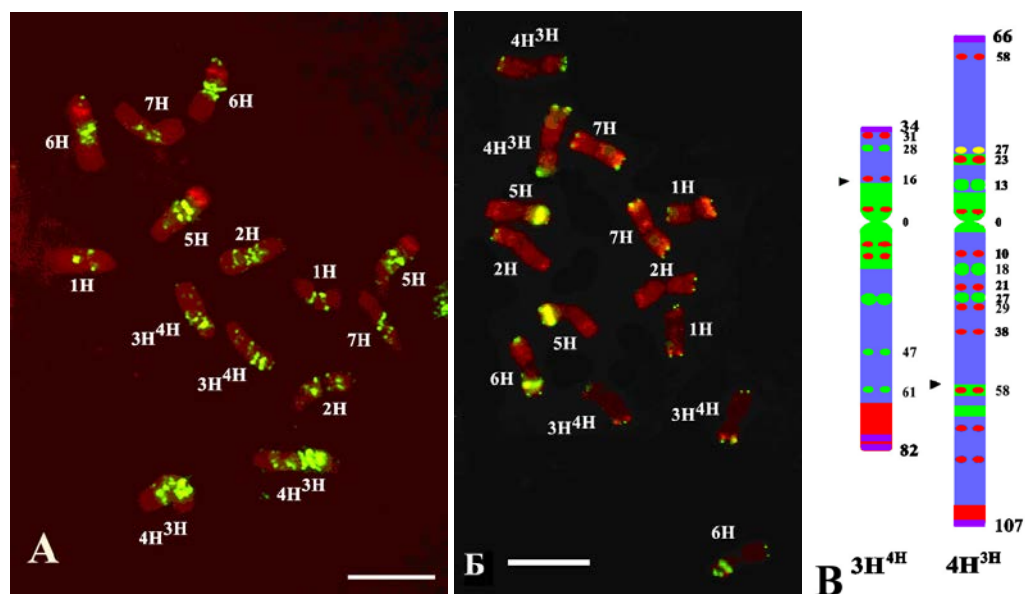
Фиг. 4. Метафазни хромозоми от ечемик от стандартния кариотип Freya (А) FISH с рибозомната ДНК проба (pTa71 - червен сигнал). Със звездички са маркирани малки рДНК хибридационни сайтове в 1Н, 2Н, 4Н и 7Н хромозомите. Новият сигнал от пробата в 2Н хромозома е белязан със стрелка. (Б) FISH с рибозомната ДНК проба (pTa71). Новите сигнали от пробата в 5Н и 6Н хромозоми са белязани със звездичка. (В) Увеличени образци от хромозоми 2Н, 5Н и 6Н в дългите рамена, на които са наблюдавани допълнителни малки рДНК хибридационни локуси.

IV. 1. 2. 3. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип T-1586. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH

IV. 1. 2. 3. 1. Характеристика на реконструирани хромозоми $3H^{4H}$ и $4H^{3H}$

Определянето на точната позиция на скъсването в 3Н хромозомата е възможно благодарение на струпването на сигнали от GAA пробата, част от които се прехвърлят в дългото рамо на 4Н хромозомата (фиг. 5 А). От друга страна появата на Afa family сигнал на позиция 16mG от центромерата в късото рамо на 3Н хромозомата (фиг. 5 А; Б), близо до перицентромерните GAA сигнали ясно определя, че мястото на скъсването, в резултат на което възниква транслокацията, се намира в непосредствена близост до този сигнал и определя прехвърляне на участък с дължина около 20mG от 4Н върху 3Н хромозомата. Това ни позволи да определим, че мястото на транслокационното скъсване в късото рамо на оригиналната 3Н хромозома е на позиция 14mG от центромерата.

Въз основа на резултатите от FISH анализа беше построена идиограма на реконструираният хромозом от кариотип T-1586, като позициите на сигналите са представени в милигеноми на фиг. 5 В.



Фиг. 5. FISH на метафазни хромозоми от линия T-1586. Локализация на повторните последователности: (А) GAA (зелен сигнал) и pTa71 (червен сигнал). (Б) Afa family (червен сигнал), pTa71 (жълт сигнал) и HvT01 (зелен сигнал). (В) Схематично представяне на позицията на сигналите GAA (зелен цвят), pTa71 (жълт цвят), HvT01 (тъмно зелен цвят) и Afa family (червен цвят) в реконструирания хромозом $3H^{4H}$ и $4H^{3H}$ от линия T-1586. Горещите точки на индуцираните транслокационни скъсвания са отбелязани в идиограмата със стрелка: ►

IV. 1. 3. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип T-21. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH

Реконструираният кариотип T-21 (фиг. 6) съдържа две реципрочни транслокации. Едната е между 3H и 4H хромозоми (Gecheff, 1989) и е идентична на описаната за кариотип T-1586, а другата е между сателитните хромозоми 5H и 6H.

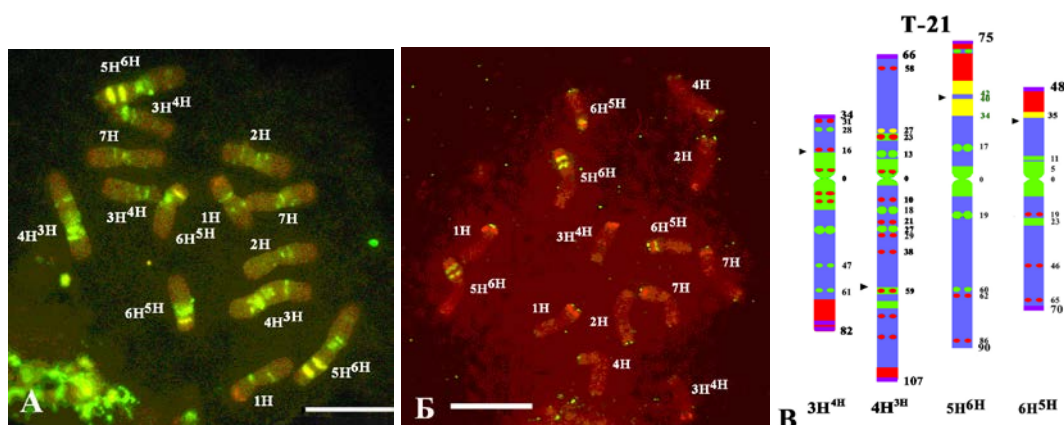
IV. 1. 3. 1. Характеристика на реконструирани хромозоми $5H^{6H}$ и $6H^{5H}$

Мястото на транслокационното скъсване се намира под NOR-а на 5H хромозома, като самият NOR на 5H хромозома се прехвърля в 6H. Както е показано на фиг. 6, част от рибозомните гени остават в късото рамо на 5H. Транслокационното скъсване в 6H хромозома е разположено под сигнал от pTa71 пробата и се намира в участък, в който

няма близки хибридизационни сигнали от нито една от четирите използвани проби. Затова мястото на транслокационното скъсване в 6H се определя след измерване на разстоянието между двата pTa71 сигнала в новата 5H^{6H} хромозома (фиг. 6).

Хибридизацията с HvT01 спомага за лесната идентификация на двете сателитни хромозоми, тъй като сигнал от тази проба липсва в дългото рамо на оригиналната 5H хромозома, а е наличен в 6H хромозомата (фиг. 6 Б).

На фиг. 6 В е представена идиограма, която отразява начина, по който се получават преустройствата в линия Т-21.



Фиг. 6. FISH на метафазни хромозоми от линия Т-21. Локализация на повторните последователности: (А) GAA (зелен сигнал), Afa family (червен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). (Б) Afa family (червен сигнал), HvT01 (зелен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). (В) Схематично представяне на позицията на сигналите (GAA, Afa family, HvT01 и pTa71) в реконструираниите 3H^{4H}, 4H^{3H}, 5H^{6H} и 6H^{5H} хромозоми в линия Т-21. Горещите точки на индуцираните транслокационни скъсвания са отбелязани в идиограмата със стрелка: ►

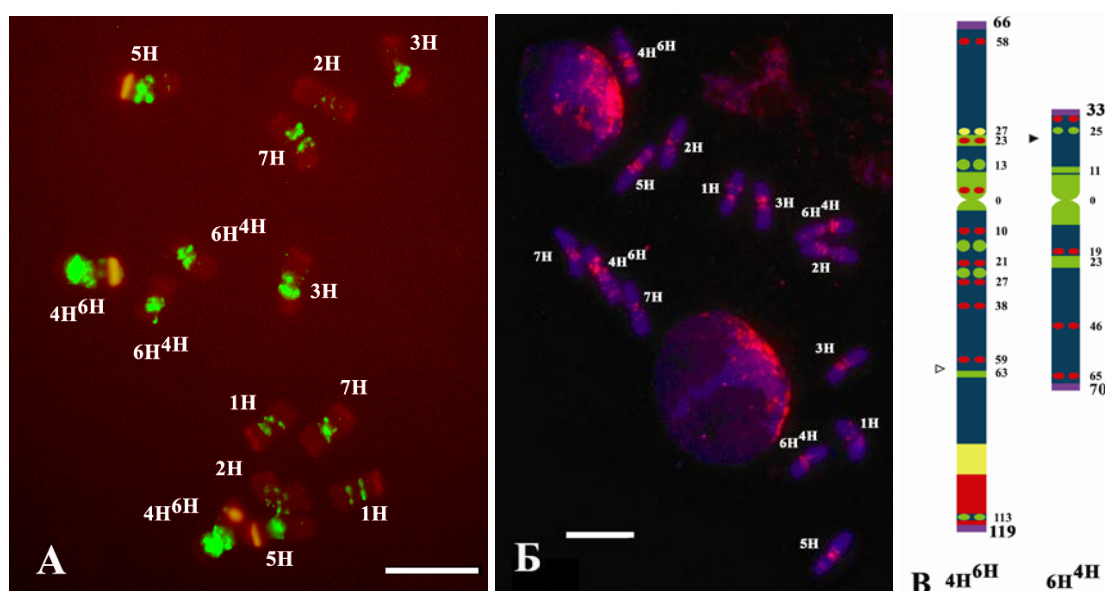
IV. 1. 4. Анализ на наблюдаваните сигнали в реконструиран кариотип D-29/46. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH

D-29/46 е вторично реконструирана линия, произхождаща от кръстосването на две транслокационни линии Т-29 и Т-46, като съдържа 4H^{6H} хромозома от линия Т-46 и 6H^{4H} хромозома от линия Т-29 (Gecheff et al., 1996). Определянето на позиция на скъсванията в хромозомите на дупликационната линия D-29/46 става по-лесно, ако се проследят местата на транслокационните скъсвания в хромозомите на изходните линии Т-29 и Т-46.

IV. 1. 4. 1. Характеристика на реконструирани хромозоми 4H^{6H} и 6H^{4H}

Сигналят GAA на позиция 69mG от оригиналната 4H хромозома на Freya се премества в реконструираната хромозома 6H^{4H} (фиг. 7 А). Именно този сигнал, заедно със следващия от Afa family пробата, успяват да ограничат участъка, в който е установена транслокацията. От линия Т-46 е пренесена само 4H^{6H} хромозома. Пренесената от линия Т-29 6H^{4H} хромозома е образувана чрез индуциране на скъсване на същата позиция в оригиналната 4H хромозома при Freya, както и при другата линия (Т-46). Значително по-трудно е определянето на позицията на транслокационното скъсване в 6H хромозомата, поради липсата на близко разположени сигнали и от трите използвани проби.

Използването на HvT01 пробата спомага за бързата идентификация на сателитната хромозома 5H, но няма отношение към възникналите преустройства, тъй като и 4H^{6H} и 6H^{4H} съдържат сигнал от тази проба и в двете си рамена (фиг. 7 Б).



Фиг. 7. FISH на метафазни хромозоми от дупликационна линия D-29/46. Локализация на повторените последователности: **(А)** GAA (зелен сигнал), Afa family (червен сигнал) и rTa71 (жълт цвят). **(Б)** HvT01 (зелен сигнал), GAA (червен сигнал) и rTa71 (жълт сигнал). **(В)** Схематично представяне на позицията на сигналите GAA (зелен цвят), rTa71 (жълт цвят) и Afa family (червен цвят), HvT01 (лилав цвят) в хромозомите 4H^{6H} и 6H^{4H} на дупликационна линия D-29/46. Горещите точки на индуцираните преустройства също са отбелязани със стрелки.

Новата линия D-29/46 притежава дуплициран участък с дължина от 12mG, който е характерен и за двете реконструирани хромозоми. В единия случай той е разположен в дългото рамо на 4H^{6H} хромозома, но е и характерен и за късото рамо на 6H^{4H} хромозома (фиг. 7).

Идиограма на реконструираниите хромозоми е представена на фиг. 7 В.

IV. 1. 2. 6. Анализ на наблюдаваните хибридизационни сигнали в мултиреконструиран кариотип РК 88-19. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH

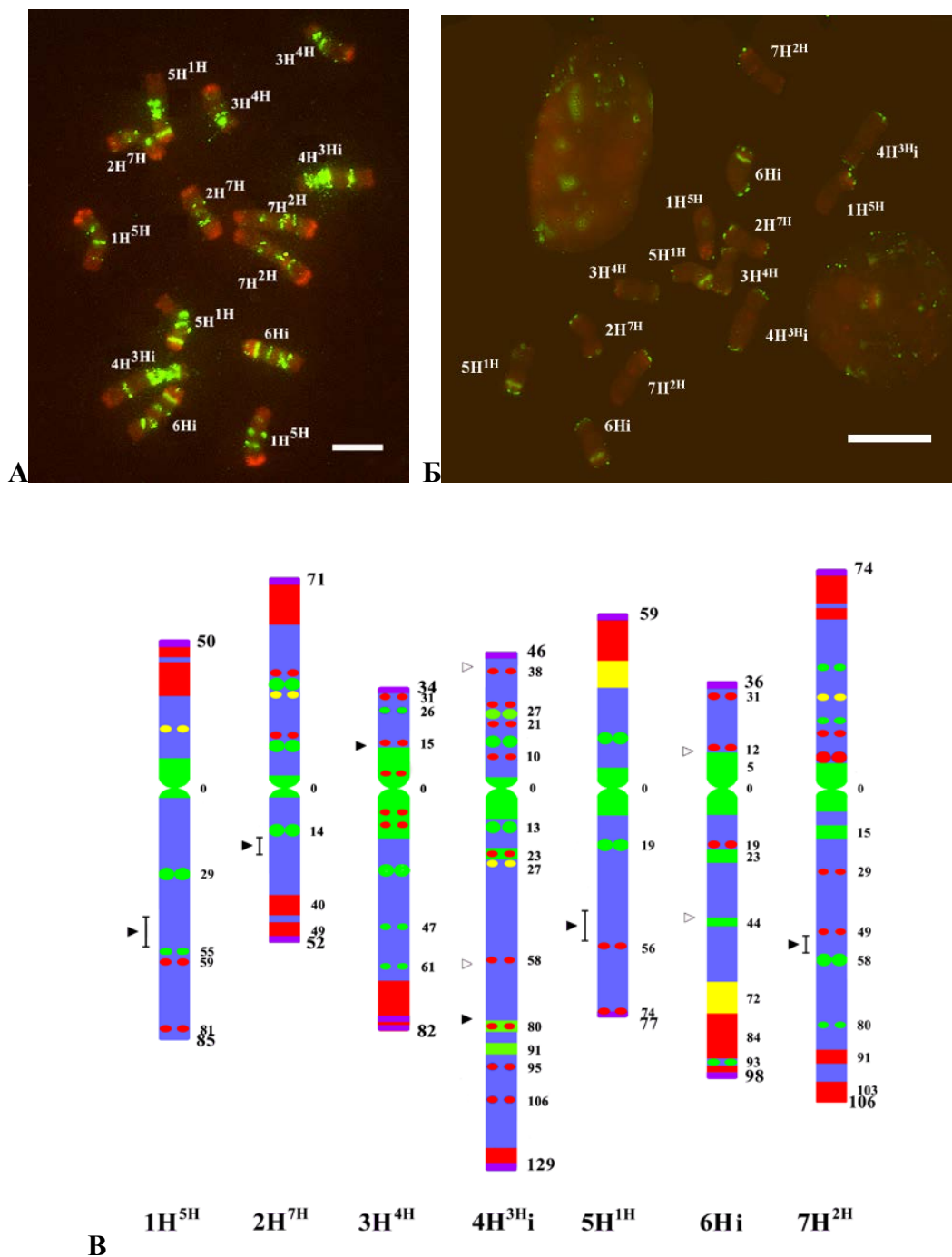
Реконструираният кариотип РК 88-19 е представен на фиг. 8.

IV. 1. 2. 6. 1. Характеристика на реконструираниите хромозоми 1H^{5H} и 5H^{1H}

Реконструираниите хромозоми 1H^{5H} и 5H^{1H} са получени в резултат на реципрочна транслокация. Резултатите от FISH анализа (фиг. 8 А; Б) показват, че точките на скъсванията са локализирани между GAA сигнал (29mG) и Afa family сигнал (51mG) в дългото рамо на 1H хромозома при Freya и в участъка над GAA family сигнал (60mG) в дългото рамо на 5H хромозома. Доказателство за обмена между двете рамена е допълнителният сигнал от GAA (55mG) пробата в реконструираната 1H^{5H} хромозома, който е характерен за 5H от стандартния кариотип Freya. При това преустройство става обмен на участъци с различна дължина, като и двете рамена от 1H и от 5H притежават два характерни Afa family сигнала, които разменят позициите си (съответно на позиция 59mG и 81mG в реконструираната 1H^{5H} хромозома и на разстояние 56mG и 74mG в реконструираната 5H^{1H} хромозома). В участъка между GAA сигнала от 1H (29mG) и Afa family сигнал (51mG), както и между двата GAA сигнала с позиция 19mG и 60mG в дългото рамо на 5H хромозома, не са идентифицирани други GAA или Afa сигнали. Това показва, че FISH техниката не може да стесни областта, в която е възникнало скъсването в по-голяма степен, отколкото N-бендинга. Вероятната област, която беше определена е с дължина 23mG чрез измерване на дължините на разменените сегменти между 1H и 5H хромозома, както и разстоянието между сигналите (фиг. 8 А; Б; В).

IV. 1. 5. 2. Характеристика на реконструирани хромозоми 2H^{7H} и 7H^{2H}

Пряко доказателство за възникналата транслокация между 2H и 7H, е прехвърлянето на GAA сигнал, оригинално разположен на разстояние 36mG от центромерата на 2H при сорт Freya. В реконструираната 7H^{2H} хромозома този сигнал се намира на разстояние 58mG от центромерата. Точната позиция на скъсването в 2H е ограничено в участъка между два GAA сигнала (14mG и 36mG).



Фиг. 8. Локализация на повторените последователности в метафазни хромозоми от линия PK 88-19. **(А)** FISH с пробите GAA (зелен сигнал), Afa family (червен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). **(Б)** FISH с Afa family (червен сигнал), pTa71 (жълт цвят) и HvT01 повторите (зелен сигнал). **(В)** Схематично представяне на позицията на сигналите GAA (зелен цвят), pTa71 (жълт цвят), HvT01 (лилав цвят) и Afa family (червен цвят). Участъците, съдържащи транслокационни и инверсионни скъсвания, са отбелязани със стрелки. ► Транслокационно скъсване; Δ Инверсионно скъсване

Локализирането на транслокационното скъсване в дългото рамо на 7Н е възможно с FISH, поради наличието на сигнал от Afa family пробата (49mG). Обменът на не еднакви по-големина участъци между двете хромозоми, води до значителното намаляване на дължината на дългото рамо на реконструираната 2Н^{7Н} хромозома (52mG) (фиг. 8).

Освен това данните показват, че точката на скъсване се намира непосредствено под GAA (14mG) в 2Н хромозома и в областта от около 5-6mG под Afa family сигнала (49mG) от 7Н. В този случай FISH техниката е много по-информативна за осъщественото преустройство и стеснява участъка, в който се намират скъсванията в двете хромозоми.

IV. 1. 5. 3. Характеристика на реконструирани хромозоми 3Н^{4Н} и 4Н^{3Н}i

Транслокациите 3Н^{4Н} и 4Н^{3Н} са анализирани в раздел 1.2.3.1 за линия Т-1586. Освен описаната транслокация в 4Н^{3Н} хромозома, чрез допълнително облъчване с гама радиация, е получена и инверсия, като точната локализация на инверсионните скъсвания става благодарение на Afa family сигналите. Afa family сигналите в късото рамо на позиция 38mG от центромерата и на 58mG в дългото рамо спомагат за определяне на дължината на инвертирания фрагмент в реконструираната хромозома. В резултат от инверсията дължината на късото рамо на реконструираната хромозома се скъсява с 20mG.

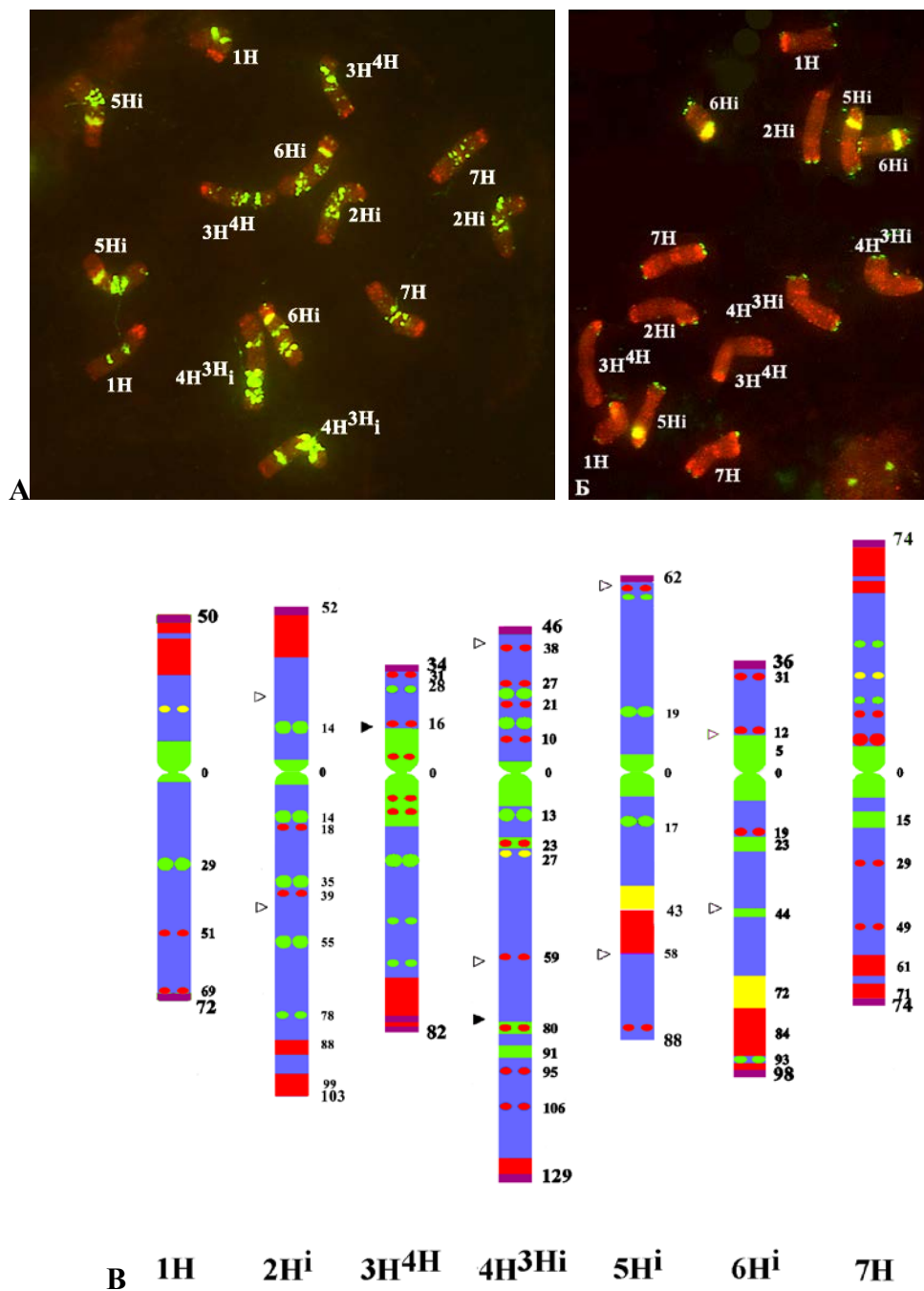
IV. 1. 5. 4. Характеристика на реконструирана хромозома 6Нi

Резултатите от проведения анализ показват, че точката на скъсване в 6Н хромозомата се намира между сигналите с позиция 5mG и 11mG, разположени в късото рамо и съответно над Afa family сигнала (46mG) от дългото рамо в 6Н хромозомата. GAA сигналът (11mG) е на близко разстояние до перицентромерния GAA сигнал (5mG) в 6Н хромозома и чрез него може точно да бъде установено мястото на скъсването в дългото рамо. Точките на скъсванията са отбелязани в идиограмата (фиг. 8 В).

IV. 1. 6. Анализ на наблюдаваните сигнали в мултиреконструиран кариотип РК 180-19. Локализиране на възникналите преустройства чрез FISH

Резултатите от FISH анализа на линия РК 180-19 са представени на фиг. 9 А; Б.

В този кариотип има две не описани досега хромозоми- 2Нi и 5Нi, които са разгледани по-долу. Описание за останалите хромозоми е представено, както следва - 1Н в раздел IV. 1. 1. 1 (характеристика на Freya), 3Н^{4Н} в раздел IV. 1. 2. 1. (характеристика на Т-1586), 4Н^{3Н}i в раздел IV. 1. 5. 3. (характеристика на РК 88-19), 6Нi в раздел IV. 1. 5. 4. (характеристика на РК 88-19), 7Н в раздел IV. 1. 1. 1. 7. (характеристика на Freya).



Фиг. 9. Локализация на повторените последователности в метафазни хромозоми от линия PK 180-19. **(А)** FISH с пробите GAA (зелен сигнал), Afa family (червен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). **(Б)** FISH с Afa family (червен сигнал), HvT01 (зелен сигнал) и pTa71 (жълт сигнал). **(В)** Схематично представяне на позицията на сигналите GAA (зелен цвят), pTa71 (жълт цвят), HvT01 (лилав цвят) и Afa family (червен цвят) в реконструиран кариотип PK 180-19. Участъците, съдържащи транслокационните и инверсионните скъсвания, са отбелязани със стрелки. ► Транслокационно скъсване; Δ Инверсионно скъсване

IV. 1. 2. 7. 1. Характеристика на реконструирана хромозома 2Нi

Наблюдаваната перичентрична инверсия променя профила на стандартната хромозома 2Н. Натрупването на сигнали от GAA (35mG) и Afa family (39mG) сондите близо до областта на скъсване в късото рамо при Freya (фиг. 9 А) спомага да бъде определена точната му позиция, означена в идиограмата.

Точката на скъсването в дългото рамо е между два GAA сигнала на позиция 14mG и 36mG в стандартната хромозома.

Хибридизацията с HvT01 сондата ясно показва преместването на сигнала от късото в дългото рамо в реконструираната хромозома (фиг. 9 Б; В).

IV. 1. 2. 7. 2. Характеристика на реконструирана хромозома 5Нi

Реконструираната хромозома 5Нi е със забележимо променена морфология (фиг. 9 В) в сравнение със стандартната хромозома 5Н, като хромозомните рамена променят дължината си, съответно на 62mG и 88mG. Скъсването в късото рамо на 5Н на стандартния кариотип е близо до теломера, в областта наситена със сигнали от Afa family сондата, като отделя съвсем малка част от хромозомата, в която е характерен сигнала от HvT01 пробата. Най-вероятната точка на скъсването в дългото рамо е между Afa family сигналите с позиция 62mG и 86mG в 5Н от стандартния кариотип. След преместването на този участък от хромозомата, сателита на 5Нi се удължава, като достига размер с близка дължина на тази на късото рамо и останалата част от дългото рамо (съответно 46mG, 42mG и 62mG). В резултат от инверсията, в реконструираната 5Нi хромозома, се наблюдава натрупване на сигнали в края на късото рамо, а именно GAA (60mG), Afa family (61mG) и теломерния сигнал HvT01 (62mG) (фиг. 9 Б; В). Посочените преустройства са изобразени в представената идиограма на фиг. 9 В.

IV. 2. Оценка на ДНК скъсвания в генома на ечемика, индуцирани чрез радиомиметика БЛМ и чрез радиация с висок (^7Li - йони) и с нисък (гама лъчи) ЛПЕ, посредством кометен анализ. Анализ на способността за възстановяване на повредите

IV. 2. 1. Фенотипна характеристика на реконструираните кариотипи Т-1586 и D-29/46

На фиг. 10 са представени два реконструирани кариотипа при ечемика Т-1586 и D-29/46, използвани в експериментите за анализ на индуцираните скъсвания и тяхната репарация. При двете линии има видими разлики във физиологичния статус, изразяващи

се в забавяне на растежа при D-29/46. Линия T-1586 не показва видими различия в развитието си при сравнение със стандартния сорт Freya, от който произлиза.



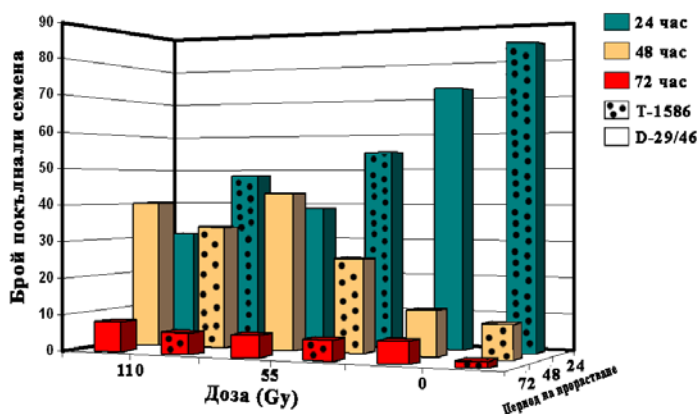
Фиг. 10. Фенотипни характеристики на транслокационната линия ечемик T-1586 (дясно) и дупликационната линия ечемик D-29/46 (ляво).

IV. 2. 2. Разработване и оптимизиране на кометния анализ при растителни тест системи като тест за анализ на скъсвания в ДНК след радиационни въздействия

Кометният анализ при растенията е подход, служещ за отчитане на нивата на скъсвания в ДНК, като позволява лесно им и бързо отчитане на ниво единични ядра. Едно от предимствата на метода е съществуването на алкален и неутрален вариант, което позволява разграничаването на едноверижните (ЕВС) от ДВС в молекулата на ДНК. Модификациите на двата протокола на кометния анализ при растенията, приложени в настоящия дисертационен труд, са свързани с методологията за изолиране на ядрата от върхна коренова меристема при ечемик, промяна в условията на лизис, електрофореза и визуализация на получените комети.

IV. 2. 3. Изследване ефекта от третиране с ^7Li -йони и гама радиация върху покълването на семената и преживяемостта

За разрешаване на тази експериментална задача бяха избрани два подхода. При първият подход бяха анализирани броят на семената, развили се до първи лист и при двете линии 72 часа след стартирането на експеримента.

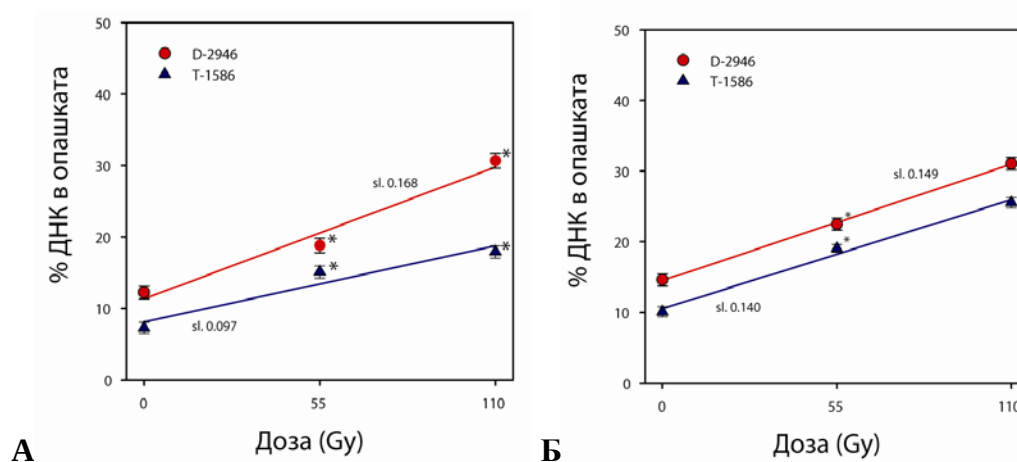


Фиг. 11. Кинетика на проращането, получена въз основа на броя покълнали семена (отчита се поява на коренче) към приложената доза гама радиация на семена от мутантните линии ечемик T-1586 и D-29/46. Всяка точка е въз основа на 100 изследвани семена.

Във вторият панел от експерименти беше отчетена появата на коренче на 24^{-ия} час и на 72^{-ия} час от началото на експеримента (фиг. 11). Резултатите показват сравнително по-бавно покълване на дупликационната линия D-29/46 в сравнение с транслокационната T-1586, както в контролите, така и в облъчените варианти. При D-29/46 се наблюдава обаче засилване на растежа 48 часа след стартиране на експеримента в сравнение с контролната линия. Установихме, че тази тенденция се запазва и на 72^{-ия} час.

IV. 2. 4. Оценка на индуцираните чрез радиационни лъчения с висок (⁷Li -йони) и нисък (гама лъчи) ЛПЕ скъсвания на ДНК в генома на ечемика с помощта на алкален кометен анализ

В предишни изследвания е показано, че облъчването с йони с висок ЛПЕ индуцират директни повреди в ДНК (Lin et al., 1996). Освен това съществуват изследвания, които показват по-висока биологична ефективност на тези йонни лъчения в растителния геном в сравнение с гама лъчите (Tanaka et al., 1997; Kikuchi et al., 2009). За да се потвърди или отхвърли тази хипотеза, бяха проведени експерименти, базирани на алкалния протокол на кометния анализ.



Фиг. 12. Ефект от прилагането на дози от 55Gy и 110Gy (А) ⁷Li- йони и (Б) гама радиация при мутантните линии ечемик-T1586 и D-29/46 чрез алкалния вариант на кометния анализ. *ОЛМ ($P < 0.001$). Error bars представя стандартната грешка.

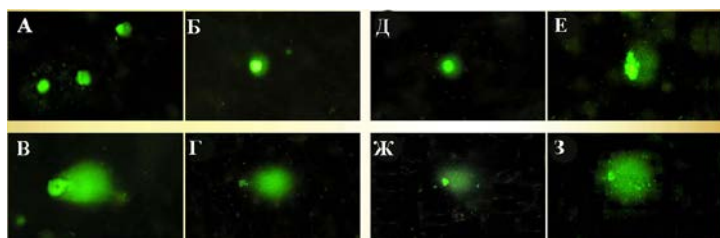
Нивото на повреди в ДНК е изобразено на фиг. 12 А. Резултатите показват, че и двете приложени дози от ⁷Li-йони имат дозово-зависимо изменение на стойностите на изследвания параметър (% на ДНК в опашката). Двете мутантни линии, участващи в изследването, демонстрират чувствителност и акумулиране на ЕВС и ДВС, като тази

чувствителност е по-силно изразена при дупликационната линия D-29/46. Повишената чувствителност на тази линия е изразена още в контролните групи, съответно 10% за T-1586 и 14% за D-29/46. Облъчването с по-високата доза ^7Li -йони запазва установената зависимост доза/отговор.

Зависимостите доза/отговор, изразяващи се в увеличаване на количеството на ДНК в опашките на кометите след прилагането на кореспондиращи дози гама радиация, са обобщени на фиг. 12 Б. Тенденцията, на плавно увеличаване на честотата на повредите, се запазва след прилагането на по-ниската доза (55Gy). По-високата чувствителност на D-29/46 отново се проявява по неоспорим начин. Прилагането на по-високата доза гама радиация води до увеличаване на контраста в наблюдавания ефект при тази линия, като достига стойности приблизително 30% за D-29/46. Това вероятно е последица от индуцирането и на друг тип повреди при по-високата доза (110Gy) гама радиация.

Като цяло стойностите на изследвания параметър са по-високи след облъчването с ^7Li -йони. Способността на алкалния кометен анализ да визуализира предимно ЕВС дава възможност да се направи извода, че ниските дози гама радиация и ^7Li -йони предизвикват предимно ЕВС. Увеличаването на дозата обаче, води до акумулирането и изявата и на ДВС след прилагането на гама радиация.

Направените визуални наблюдения на кометите, наблюдавани след прилагане на ^7Li -йони и гама радиация показват, че съществува минимална разлика в профила на кометите, получени след облъчване с ^7Li -йони и тези, получени след облъчване с гама радиация, като тази разлика се отнася най-вече за плътността и интензитета на опашката на кометите (фиг. 13).

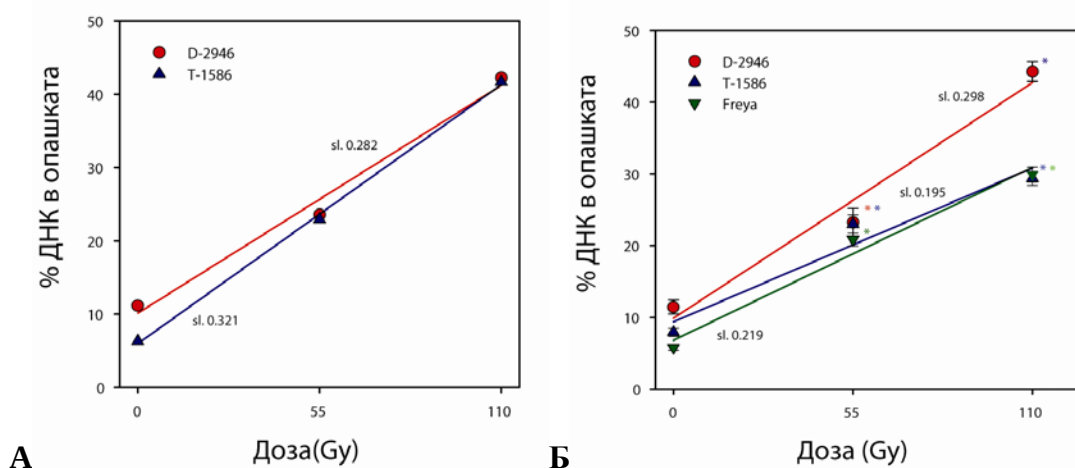


Фиг. 13. Представителни изображения на комети, получени в контролата (А), при облъчване на семена с ^7Li -йони (Б, В, Г) и гама лъчи (Д, Е, Ж, З).

IV. 2. 5. Оценка на индуцираните чрез радиационни лъчения с висок (^7Li -йони) и нисък (гама лъчи) ЛПЕ скъсвания на ДНК в генома на ечемика с помощта на неутрален кометен анализ. Анализ на способността за възстановяване на повредите

Сравнителната оценка на процента на индуцираните ДВС е представена на фиг. 14. Резултатите показват по-силно изразената чувствителност на реконструирания кариотип D-29/46 по отношение на контролната линия Freya и T-1586 и при двата типа облъчване (^7Li -йони и гама лъчи). Тази чувствителност е по-ясно отличима след прилагане на 110Gy гама лъчи (фиг. 14 Б). Относителната честота на повредите е много по-висока за гама лъчите, което вероятно се дължи на акумулирането на ДВС в ДНК.

При облъчването със същите дози ^7Li -йони, въпреки известна разлика между T-1586 и D-29/46 по отношение на индукцията на ДВС в контролите, при облъчените варианти тенденцията на индукция на скъсванията е почти еднопосочна (фиг. 14 А).

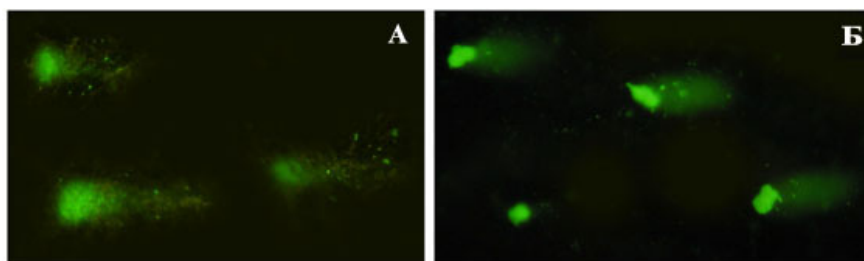


Фиг. 14. Анализ на ДНК скъсванията в суперспирализираните бримкови домени след облъчване с (А) ^7Li -йони и (Б) гама радиация на линии Freya, D-29/46, T-1586 чрез неутралния вариант на кометния анализ.*ОЛМ ($P < 0.001$).

Като цяло резултатите показват различия в отговора между двата реконструирани кариотипа в зависимост от приложената доза облъчване. Представената фиг. 14 Б показва тенденцията на слабо увеличаване на нивото на повредите при линни Freya и T-1586. Индукцията на повреди при D-29/46 е много по-ясно изразена след прилагането на доза от 110Gy гама лъчи (фиг. 14 Б). Това потвърждава направения по-горе извод, че облъчването на сухи семена с ^7Li -йони и гама радиация води до формирането на скъсвания, както ЕВС, така и ДВС в ДНК на клетките от кореновата меристема на ечемика по време на покълването (фиг. 14).

Експерименталната схема на нашето проучване показва, че облъчването с ^7Li -йони на сухи семена от ечемик се проявява в пострадиационно индуциране на ЕВС и ДВС по време на покълването на семената, като съотношението на двата типа скъсвания варира в зависимост от дозата. Освен наблюдаваната разлика в чувствителността на двете линии беше установена и разлика в структурата на кометите, получени след прилагане на една и съща доза ^7Li -йони (фиг. 15 А, Б).

Специфичният отговор на реконструирания кариотип D-29/46 спрямо ^7Li -йони може да се дължи и на различните механизми на първичната индукция на повредите в ДНК, в сравнение с гама лъчите. Облъчването на сухи семена от ечемик с ^7Li -йони доведе до приблизително еднакъв процент на ЕВС и ДВС и при двете линии, в сравнение с ефекта на съответните дози на ЙР. Тези изследвания са в подкрепа на получените по-рано резултати показващи, че облъчването на плазмид рMTa4 с ^7Li -йони индуцира предимно ДВС, които се наблюдават предимно в обогатени на гуанин - цитозин участъци (Humtsoe et al., 2003). Що се отнася до наблюдавания уеднаквен отговор на двата кариотипа след облъчване с йони с висок ЛПЕ (^7Li -йони), това вероятно е свързано със специфични репарационни активности или с различни нива на молекули, обезвреждащи радикалите, или с промени на хроматиновата компактизация.



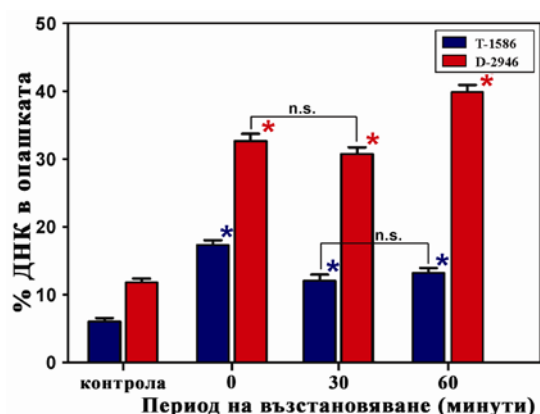
Фиг. 15. Представителни микрофотографии на типичните профили на миграция на ДНК, получени след прилагане на неутралния кометен анализ на мутантни линии ечемик (А) T-1586 и (Б) D-29/46, след облъчване с 55Gy ^7Li -йони.

IV. 2. 6. Анализ на кинетиката на репарация на индуцирани повреди след прилагане на 100Gy гама лъчи върху ядра от реконструирания кариотипи T-1586 и D-29/46 чрез неутрален вариант на кометния анализ

Фиг. 16 представя степента на възстановяване на предизвиканите скъсвания след облъчване със 100Gy гама радиация през ранните периоди за възстановяване - 30 и 60 минути. Представените данни показват, че поведението на двата кариотипа се различават

значително. Наблюдавахме сравнителна бързо, макар и слабо намаляване на количеството на геномните повреди при използваната в изследването контролната линия T-1586. Обратно при D-29/46 е показана почти пълна липса на потенциал за възстановяване на повредите дори и час след облъчването. При тази линия е характерна и тенденция към постепенно натрупване на повреди в хода на репаративната инкубация.

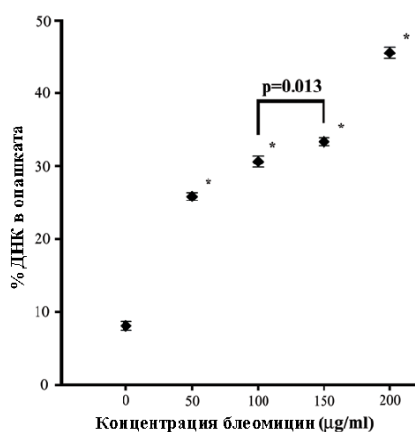
Резултатите от първичната индукция на скъсванията в ДНК-веригите след облъчване с гама лъчи показват по-висока чувствителност на реконструирания кариотип D-29/46 в сравнение с родителските, която се илюстрира от наклона на съответните криви доза-отговор (фиг. 14). Очевидно е, че репаративния потенциал на тази линия за ДВС, също е засегнат (фиг. 16). Подобни изследвания съществуват при БЛМ третираните растения *Arabidopsis*, при които експресията на AtKU70 и AtKU80 гени е свързано с механизмите на нехомоложното възсъединяване на краищата (НХВК) (Tamura et al., 2002).



Фиг. 16. Ранна кинетика на репарация на ДВС след облъчване с 100Gy гама лъчи в геномна ДНК на ечемичните линии T-1586 и D-29/46, анализирани чрез неутрален кометен анализ.

*ОЛМ ($P < 0.05$) n.s., няма статистически значима разлика.

IV. 3. Оценка на индукцията и кинетиката на репарация на предизвиканите от БЛМ скъсвания в генома на ечемика чрез неутрален кометен анализ

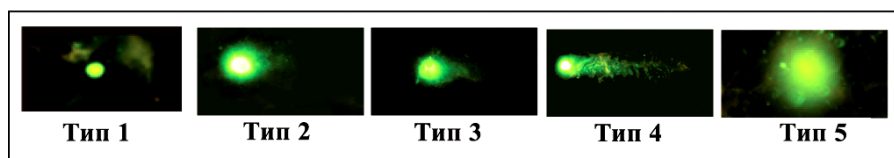


IV. 3. 1. Индукция на ДВС след третиране с БЛМ

Фиг. 17. Стойности на средното на параметъра '% ДНК в опашката' ($\pm$ SE) получени след третиране с четири различни концентрации БЛМ (50, 100, 150 и 200 µg/ml) в съответните кометни популации. *ОЛМ ($P < 0.001$).

Резултатите от неутралния вариант на кометния анализ, получени от контролни и изолирани непосредствено след третирането с различни концентрации БЛМ коренови връхчета ечемик от линия Т-1586, са представени на фиг. 17.

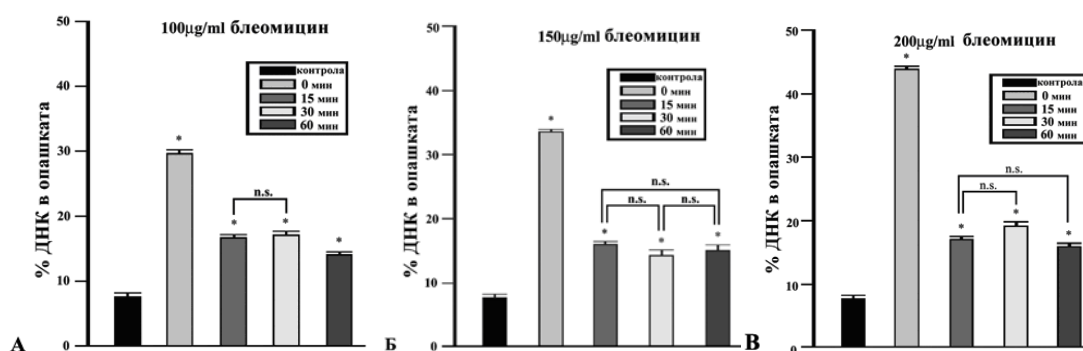
Данните показват, че дори и най-ниската приложена концентрация БЛМ (50µg/ml) е достатъчна да утрои базовото ниво на повреди в ДНК. От фигурата се вижда, че количеството на индуцирани повреди в ДНК съответства на приложените концентрации БЛМ и има почти линеен дозово-зависим характер. Типичният профил на комети, получени при неутрални условия, е показан на фиг. 18.



Фиг. 18. Представителни изображения на различни типове комети, показващи постепенното нарастване на повредите в ДНК, получени след прилагането на неутралния вариант на кометния анализ.

IV. 3. 2. Репарационна кинетика на ДВС, получени след третиране с БЛМ

Резултатите от изследваната репарационна кинетика на ДВС, получени след третиране със 100µg/ml, 150µg/ml и 200µg/ml БЛМ, са представени на фиг. 19 А; Б; В.



Фиг. 19. Репарация на ДВС, базирана на параметъра % ДНК в опашката ($\pm$ SE) при коренови връхчета от ечемик при различни периоди на възстановяване след третиране с БЛМ. (А) 100µg/ml; (Б) 150µg/ml; (В) 200µg/ml.

**ОЛМ ($p < 0.001$). n.s., няма статистически значима разлика.*

Наблюдава се ефективна репарация на ДВС още след първите 15 мин след обработката с БЛМ на кореновите прорастъци от ечемик *in vivo*. Процентът на невъзстановените повреди след 1 час репарация е около 50% от първоначалните след третирането с по-ниските концентрации БЛМ. Изненадващо е, че дори след прилагането на най-високата концентрация БЛМ, е наблюдавано ясно изразено възстановяване.

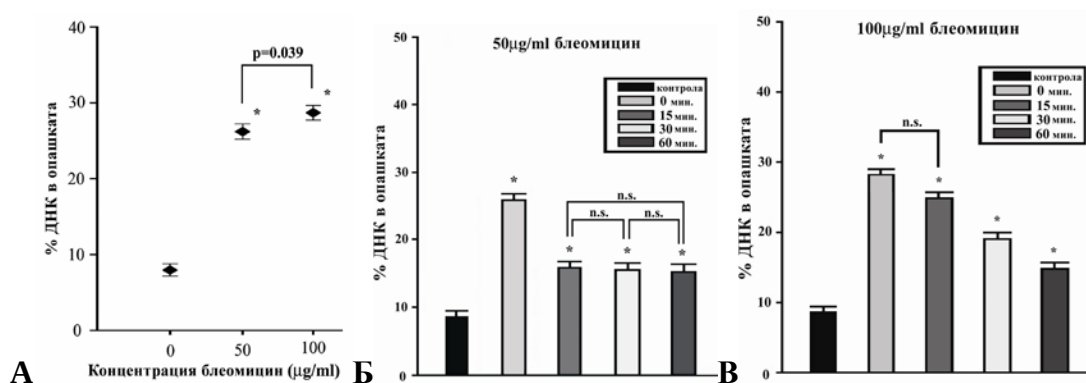
Възможно обяснение за наблюдаваното бързо възстановяване на индуцираните БЛМ повреди може да е свързано с дизайна на извършените експерименти. Наблюдаваният ефект силно наподобява на механизми, които не са описани все още за растенията като т. нар. “delayed plating” или “liquid-holding recovery“, но са съобщени при животински клетки и дрожди (Roberts and Aldous, 1949; Kiefer and Wienhard, 1980). Тези явления са свързани с увеличаване на преживяемостта на облъчени клетки, поставени в буфер, дължащо се на частично възстановяване на индуцираните повреди. Последни аналогични изследвания ясно очертават функционирането и на двата основни репарационни механизма – хомоложна рекомбинация и НХВК (Nunes et al., 2008).

IV. 3. 3. Индукция и репарация на ЕВС, получени след третиране с БЛМ

Фиг. 20 илюстрира резултатите, получени чрез анализ посредством алкалния вариант на кометния анализ след третиране с две различни концентрации БЛМ. Данните показват, че честотата на първоначално индуцираните скъсвания в ДНК не съответстват напълно на приложените концентрации БЛМ (фиг. 20 А). Въпреки наблюдаваното насищане на първичния ефект с увеличаване на концентрацията БЛМ, нашите данни са в съгласие с данни, получени при третиране на епидермални белодробни клетки в същия концентрационен порядък (He et al., 2001). Съпътстващият скрининг за наличие на ДВС и ЕВС е доказан и в предишни проучвания, разкриващи запазването и на двата типа повреди след третиране на коренови прорастъци от ечемик с БЛМ (Manova et al., 2006). Съществуват и доказателства за способността на БЛМ да индуцира и двата типа повреди над определен концентрационен праг (Benitez-Bribiesca and Sanchez-Suarez, 1999; Chen and Stubbe, 2004).

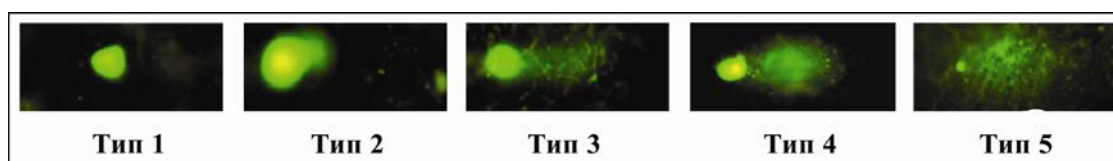
Репарационната кинетика на ЕВС е представена на фиг 20 (Б) и (В). Наблюдаваната репарационна способност е значително по-висока след прилагане на 50µg/ml БЛМ непосредствено след третирането, като тази тенденция се запазва и в последствие. След прилагането на 100µg/ml беше необходим най-малко 1 час възстановяване, за да достигне нивото повредите в ДНК това, наблюдавано 15 мин след третиране с по-ниската концентрация БЛМ.

Забавената репарация на повредите, наблюдавана след анализа с алкалния вариант на кометния анализ, в сравнение с възстановяването на ДВС, вероятно се повлиява от по-широкия спектър от повреди, който се анализират при алкални условия и съответно от необходимостта от активиране на повече репарационни механизми, необходими за тяхното възстановяване.



Фиг. 20. Първична индукция (**А**) и кинетика на възстановяване (**Б, В**) на скъсвания в ДНК, индуцирани чрез БЛМ и анализирани чрез алкален вариант на кометния анализ. *ОЛМ ($P < 0.001$). n.s., няма статистически значима разлика.

Представителни изображения за всяка една категория комети, получени чрез алкалния вариант на кометния анализ, са представени на фиг. 21.



Фиг. 21. Представителни изображения на различни типове комети, представящи постепенното нарастване на повредите в ДНК, получени след прилагането на алкалния вариант на кометния анализ.

IV.4. Статистически подходи за анализ на данните - описателна статистика, оценка на варирането, избор на разпределение, параметрични и непараметрични статистически тестове

Коректната статистическа обработка на резултатите, получени в резултат от прилагането на кометния анализ, е от важно значение за правилната интерпретация на наблюдаваните ефекти.

Тестът за качество на приближението („Goodness of fit”) е статистическа характеристика, която описва разпределението, което най-добре пасва на дадена извадка от данни. Нашето изследване е фокусирано върху сравнение на два критерия - на непараметричния Колмогоров-Смирнов и параметричния критерий χ^2 , използвани за анализ на разпределението на данните. Тези статистически подходи могат да бъдат използвани като статистическо приложение след обработката на изображенията. Тяхното прилагане разширява и влияе върху интерпретацията на резултатите.

Върху фиг. 22 е направен обобщен преглед на резултатите, получени при сравнението на различните типове разпределение на данните, съответно: ограничени, неограничени, не отрицателни и сложни.

Сравнителният преглед на данните контролите показва, че най-подходящите разпределения са от непрекъснат тип. Например според непараметричния Колмогоров Смирнов критерии, разпределението на Дагум (Dagum) е едно от най-подходящите, докато според χ^2 критерият повече пасват разпределенията на Джонсън S_B (Johnson S_B), Обобщено Парето (Generalized Pareto) и разпределението на Гумбел (Gumbel Max).

В нашия анализ на данните най-подходящо разпределение, описващо резултатите от третирането с концентрация 50 μ g/ml БЛМ е Обобщено разпределение на Парето. Това разпределение е уместно при описание на крайностите (най-големите или най-малките стойности). В случаите на по-слаб ефект от третирането с БЛМ, част от популациите от комети се състоят от такива, чийто параметър е с ниски стойности, а друга част образува група с по-високи стойности в сравнение с предишната. Въз основа на подбора по ранг, разпределенията Джонсън S_B и Дагум също са приемливи за описание на данните, получени след третиране с 50 μ g/ml БЛМ.

При третиране с по-високи концентрации на БЛМ (100 μ g/ml, 150 μ g/ml и 200 μ g/ml) ясно се отличава пасването на ограничения тип разпределение на Джонсън S_B , което е гъвкаво. Теоретично неговата функция на разпределение на плътността на вероятността е удобна за характеризиране на съотношения, или на случайни величини ограничени от екстремни стойности. Това разпределение често се използва в изследванията, отнасящи се до влиянието на различни фактори от околната среда върху човека, разпределението на валежите, в областта на епидемиологията и в лесовъдството (Flynn, 2004). В обобщение можем да посочим, че във всички случаи независимо рангът,

който е определил теста за качество на приближението при двата критерия Колмогоров Смирнов и χ^2 , нулевата хипотеза на разпределението на Джонсън S_B не може да бъде отхвърлена (фиг. 22).

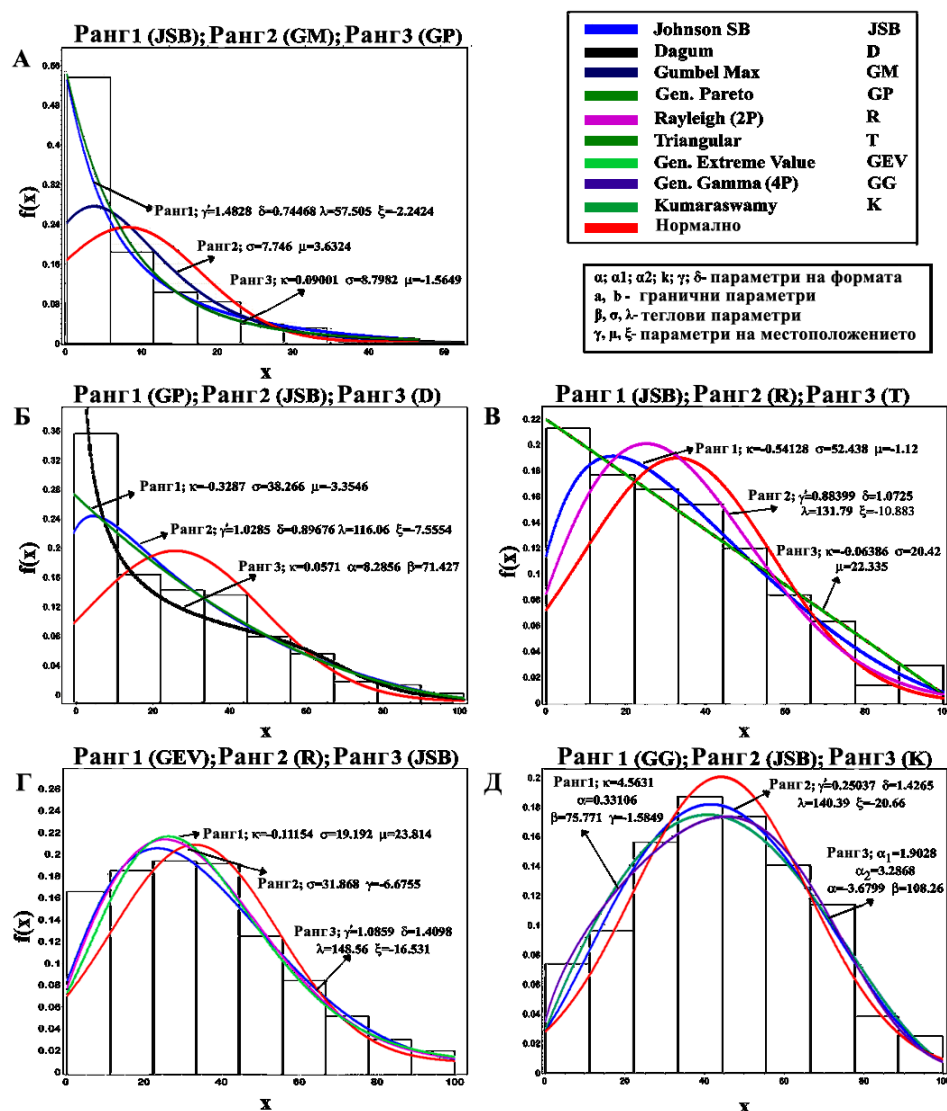
IV. 4. 1. Обобщени линейни модели

Използваните в дисертационния труд ОЛМ до голяма степен решават съществуващите проблеми с оценките и изменчивостта на резултатите от кометния анализ въз основа на различни ефекти – различни концентрации БЛМ, вариране на средната стойност на изследвания параметър между отделните препарати и др. ОЛМ предоставя регресионен анализ и анализ на дисперсията за една зависима променлива или няколко фактора (независими) променливи. Променливата дели популацията от данни на групи. ОЛМ тества нулевата хипотеза за ефекта на другите променливи върху средните, проучва взаимодействията между факторите и ефектите на индивидуалните фактори, някои, от които могат да са случайни.

От друга страна е изключително важно подбраният от нас статистически тест да е гъвкав и да може да се прилага върху данни, които не са нормално разпределени т.е да не се влияе от от вътрешното разпределение на извадката от данни. ОЛМ е именно такъв тест и често векторът на изследвания параметър (y) може да бъде описан за почти всяко разпределение, включително и за различни експотенциални разпределения като нормалното, бинормалното, Poisson (Пуасон), гама разпределение Вейбул и др. (Venter, 2008). Едно от предимствата на този статистически подход, който определя и неговата гъвкавост е, че разпределения със сходни отклонения на средното могат да имат различни “tail” характеристики на остатъците, включително и различни коефициенти на асиметрия и моменти на оценка на варирането от по-висок порядък (дисперсии, корелации) (англ. higher moments) (Venter, 2008).

В това изследване ние показахме няколко удобни подходи, при които разпръснатите и вариращи по стойности данни, получени след използването на кометния анализ, могат и следва да бъдат приложени в зависимост от типа на участващите в изследването данни. Проведените проучвания показват, че за описание на данните от кометния анализ при растенията, най-подходящата от използваните процедури се оказва χ^2 Джонсън S_B . Установеното при анализа на данните S_B разпределение на Джонсън представя данните чрез логит трансформация на случайните променливи, което довежда в крайна сметка до нормалност (Flynn, 2004). Използването на ОЛМ правят възможно описанието на скритите ефекти, явяващи се в резултат от дадено въздействие.

Функция на плътност на вероятността



Фиг. 22. Разпределителна честота въз основа на χ^2 теста върху наблюденията от параметъра % ДНК в опаиката и сравняване на реалните разпределения с най-висок ранг. (А) контрола, (Б) 50 μ g/ml БЛМ, (В) 100 μ g/ml БЛМ, (Г) 150 μ g/ml БЛМ, (Д) 200 μ g/ml БЛМ. Нормалното разпределение е представено само за сравнение.

Акценти от глава IV. 1

Прилагането на молекулярно-цитогенетични подходи (FISH техниката) в настоящата дисертация позволи съставянето на информативни физични карти на ечемичните линии - Freya, T-1586, T-21, D-29/46, PK 88-19 и PK 180-19. Изучаването на сигналите от подбраните за изследването проби (GAA, pTa71, Afa family и HvT01) позволи:

- Характеристика на хромозомите на стандартния кариотип Freya и сравняване на профила на разпределение на GAA пробата с гимза N бендинга. Разлики в сравнените профили бяха установени в дългите рамена на 2H (59mG), 3H (47mG и 61mG), 4H (69mG) и 7H (15mG), както и в късите рамена на 5H (17mG) и 6H (59mG), където FISH техниката отчете сигнали.
- Установяване на допълнителни сигнали на рибозомните РНК гени в дългите рамена на хромозоми 2H (31mG) 5H (34mG) и 6H (55mG) на стандартния кариотип Freya.
- Характеристика на участъците, в които са възникнали транслокационните скъсвания в реконструираните хромозоми $3H^{4H}$, $4H^{3H}$ (T-1586) и $5H^{6H}$, $6H^{5H}$ (T-21).
- Характеристика на реконструираните хромозоми $4H^{6H}$, $6H^{4H}$ в реконструиран кариотип D-29/46 и установяване на участъците, в които са възникнали транслокационните скъсвания и дължината на дублицирания участък (12mG).
- Характеристика на реконструираните хромозоми $1H^{5H}$ и $5H^{1H}$ (PK 88-19), $2Hi$ (PK 180-19), $2H^{7H}$ и $7H^{2H}$ (PK 88-19), $4H^{3Hi}$ (PK 88-19; PK 180-19), $5Hi$ (PK 180-19) и $6Hi$ (PK 88-19) в мултиреконструираните кариотипи ечемик и установяване на участъците, в които са възникнали транслокационните и инверсионните скъсвания.

Акценти от глави IV. 2 и IV.3.

През последното десетилетие изучаването на ефекта от радиационните облъчвания с висок и нисък ЛПЕ придоби изключителна актуалност. Изследванията в това направление на радиационната биология са от важно значение за контрола и оценката на риска от определени лъчения. В настоящата дисертация бяха разгледани ефектите, които се наблюдават след прилагане на гама радиация, лъчения от тежкия

изотоп на лития (^7Li) и радиомиметика БЛМ. Оценката от ефекта от посочените агенти беше извършен върху два типа мутантни линии – транслокационна и дупликационна. Икономическите ефекти на тези мутантни вариетети ще си останат скрити, тъй като се нуждаят от реални полеви експерименти. Информацията за промяната в чувствителността е ясна индикация за нарушение на генетичните и метаболитните механизми при изследваните кариотипи. Проследяването на чувствителността на ечемичните кариотипи с геномно преустройство (транслокация или дупликация), се базира на анализ на първичната индукция на повреди, главно скъсвания в ДНК (ЕВС и ДВС). В настоящата дисертация са оптимизирани методиките на кометния анализ, чрез които са:

- анализирани количеството и типа на скъсванията в генома на ечемика след облъчване с ЙР с висок (^7Li -йони) и нисък (гама радиация) ЛПЕ, като е доказано, че ^7Li -йони индуцират и двата типа скъсвания.
- установени са различия в отговора на двата структурни мутанта- T-1586 и D-29/46, като дупликационната линия показва по-висока чувствителност към индуциране и на двата типа скъсвания, като показва и загуба на репарационен капацитет.
- проследени са ефектите от третирането с БЛМ, което води до индуциране на ЕВС и ДВС в генома на ечемика и е наблюдавана е ефективна репарация на ДВС в кратки времеви интервали, непосредствено след третирането

Акценти от глава IV. 4.

Известно е, че всеки организъм, било то растителен, животински или друг, се стреми да се справи с въздействията от околната среда като се наблюдава тенденция към увеличаване на взаимния информационен обмен между генотипа, въздействието на околната среда и проявения фенотип (Wagensberg, 2000). Навлизането в областта на феномиката, като отражение на взаимовръзката между тези три компонента, е едно от най-новите предизвикателства на нашия век (Houle et al., 2010). В настоящата дисертация са представени само някои аспекти на актуалните проблеми за взаимовръзката между фенотипната пластичност, структурната генотипна комплементарност и чувствителността на генома към изменение на факторите на околната среда. Взаимодействията на тези основни компоненти са основната движеща сила на еволюционния процес (Andrade, 2005).

За да бъдат проследени тези аспекти е необходимо използването на правилни подходи за дизайн и оценка на отчетените ефекти. Затова в настоящата дисертация бяха представени основните статистически подходи и чрез тях се установи, че:

- статистическото разпределение, описващо данните на параметъра %ДНК в опашката от кометния анализ при растенията, е Джонсън S_B по критерия χ^2 , поради неговата гъвкавост и способността му да описва съотношения или случайни величини ограничени от екстремни стойности.
- използването на ОЛМ са удачен подход за анализ на резултатите от кометния анализ при ечемика, тъй като чрез тях е възможно да бъдат сравнявани данни, които имат сходни отклонения на средното, различни “tail” характеристики на остатъците, различни коефициенти на асиметрия и моменти на оценка на варирането от по-висок порядък (дисперсии, корелации).

V. ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати, могат да бъдат формулирани следните основни изводи:

1. Установена е физическата локализация на повторените последователности GAA, Afa-family, pTa71 и HvT01 в стандартния кариотип Freya и реконструирания кариотип ечемик T-1586, T-21, D-29/46, РК 88-19 и РК 180-19. Прецизирани са участъците на транслокационните и инверсионните скъсвания.
2. Анализирани са честотата и типа на ДНК скъсванията в генома на ечемика след облъчване с ЙР с висок (^7Li -йони) и нисък (гама радиация) ЛПЕ. Доказано е, че ^7Li -йони индуцират както ЕВС, така и ДВС.
3. Характеризирани са различията в радиационния отговор на структурните мутанти T-1586 и D-29/46. Реконструираният кариотип D-29/46 проявява по-висока чувствителност по отношение и на двата типа скъсвания в ДНК, както и нисък репаративен потенциал.
4. Наблюдавана е ефективна репарация на ДВС, индуцирани от блеомицин в генома на ечемика непосредствено след третирането, като честотата на невъзстановените повреди 1 час след третирането е около 50% от първично индуцираните.
5. Джонсън S_B е най-типичното статистическо разпределение, описващо данните на параметъра „%ДНК в опашката” от неутралния кометен анализ при растенията. Обобщените линейни модели са подходящ подход за обективна оценка на статистическата достоверност на резултатите от кометния анализ при ечемика.

VI. ПРИНОСИ

- Локализацията на радиационно-индуцираните хромозомни преустройства в серия реконструирани кариотипи ечемик предполага ефективното им използване като моделни системи в цитогенетичния анализ на тази култура.
- Идентифицирани са три нови минорни рДНК локуса в генома на ечемика, хомоложни на рибозомните РНК гени.
- Оптимизиран е неутралният вариант на кометния анализ при ечемика. Този подход позволява анализ на интегритета на ДНК непосредствено след мутагенната обработка.
- За първи път е извършен комплексен анализ на статистическото разпределение на данните от кометния анализ при растенията и са използвани Обобщените линейни модели за проверка на статистическата достоверност.

VII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Andrade E. 2005. *S.E.E.D. Journal* 5(2):27-65.
2. Belostotsky D.A., Ananiev E.V. 1990. *Theor. Appl. Genet.* 80(3):374-380.
3. Benitez-Bribiesca L., Sanchez-Suarez P. 1999. *Ann. NY Acad. Sci.* 887:133-149.
4. Chen J., Stubbe J. 2004. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:175-181.
5. Dennis E.S., Gerlach W.L., Peacock W.J. 1980. *Heredity* 44:349-366.
6. Flynn M.R. 2004. *Ann. Occup. Hyg.* 48(7):617-622.
7. Gecheff K., Manova V., Bonchev G., Kitanova M., Vlahova M., Stoilov L. 2008. *Genetics & Breeding* 37:3-8.
8. Gecheff K., Papazova N., Telbizova T. 2003. *Plant Sci.* 40:103-106.
9. Gecheff K.I. 1978. *Genet Pl Breed (Bul)* 11:17-22.
10. Gecheff K.I. 1989. *Theor. Appl. Genet.* 77:705-710.
11. Gecheff K.I. 1996. *Theor. Appl. Genet.* 92:777-781.
12. Gerlach W.L., Bedbrook J.R. 1979. *Nucleic Acids Res.* 7:1869-1885.
13. Gerlach W.L., Dyer T.A. 1980. *Nucleic Acids Res.* 8 (21):4851-4865.
14. Gichner T., Ptáček O., Stavreva D.A., Plewa M.J. 1999. *Environ. Mol. Mutagen.* 33:279-286.
15. He Y.H., Wu M., Kobune M., Xu Y., Kelley M.R., Martin W.J. 2001. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:692-698.

-
16. Houle D., Govindaraju D.R., Omholt S. 2010. *Nat. Rev. Genet.* 11(12):855-66.
 17. Humtsoe J.O., Schneeweiss F.H.A., Srivastava A., Sarma A., Sharan R.N. 2003. *Radiation Eff. Defects Solids*, 158:603–607.
 18. Kiefer J., Wienhard I. 1980. *Int. J. Radiat. Biol.* 37(3):343-346.
 19. Kikuchi S., Saito Y., Ryuto H., Fukunishi N., Abe T., Tanaka H., Tsujimoto H. 2009. *Mutat. Res.* 669:63–66.
 20. Koppen G., Cerda H. 1997. *Lebenson-Wiss. Technol.* 30:452–457.
 21. Koppen G., Angelis K.J. 1998. *Environ. Mol. Mutagen.* 32:281–285.
 22. Koppen G., Toncelli L.M., Triest L., Verschaeve L. 1999. *Mech. Ageing Dev.* 110:13–24.
 23. Koppen G., Verschaeve L. 1996. *Mutat. Res.* 360:193–200.
 24. Koppen G., Verschaeve L. 2001. *Folia Biol (Prague)* 47:50–54.
 25. Künzel G., Korzun L., Meister A. 2000. *Genetics* 154:397-412.
 26. Lovell D.P., Thomas G., Dubow R. 1999. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 19:109–119.
 27. Lin M., Yang J.C., Liu L.X., Zheng X.Y., Zheng Q.C., Bai X.X., Zhao W.R. 1996. *J. Agric. Biotechnol.* 4:93–94.
 28. Manova V., Gecheff K., Stoilov L. 2006. *Mutat. Res.* 601: 179-190.
 29. Martins C., Wasko A.P., Oliveirat C., Wright J.M. 2000. *Hereditas* 133:39-46.
 30. Molnár-Láng M., Linc G., Friebe R.B., Sutka J. 2000. *Euphytica* 112:117–123.
 31. Nagaki K., Tsujimoto H., Isono K., Sasakuma T. 1995. *Genome* 38:479–486.
 32. Nunes E., Candrea E., Bracesco N., Sánchez A., and Dell M. 2008. *J.Biol.Phys.* 34(1-2):63–71.
 33. Pedersen C., Linde-Laursen I. 1994. *Chromosome Res.* 2:67–71.
 34. Pedersen C., Rasmussen S.K., Linde-Laursen I. 1996. *Genome* 39(1):93-104.
 35. Rayburn A.L., Gill B.S. 1986. *J. Hered.* 77:253–255.
 36. Roberts R.B., Aldous E. 1949 *J. Bacteriol.* 57(3):363–375.
 37. Röder M.S., Lapitan N.L., Sorrells M.E., Tanksley S.D. 1993. *Mol. Gen. Genet.* 238(1-2):294-303.
 38. Sajdak S.L., Reed K.M., Phillips R.B. 1998. *J. Mol. Evol.* 46:680-688.
 39. Sharp P.J., Kreis M., Shewry P.R., Gale M.D. 1988. *Theor. Appl. Genet.* 75:286-290.
 40. Szakács É., Molnár-Láng M. 2006. *Genome* 50(1):43-50.
 41. Tamura K., Adachi Y., Chiba K., Aguchi K., Takahashi H. 2002. *Plant J.* 29:771–781.
 42. Tanaka A., Shikazono N., Yokota Y., Watanabe H., Tano S. 1997. *Int. J. Radiat. Biol.* 72:121–127.
 43. Tsujimoto H., Mukai Y., Akagawa K., Nagaki K., Fujigaki J., Yamamoto M., Sasakuma T. 1997. *Genes Genet. Syst.* 72:303–309.
 44. Van't Hoff J. 1975. *Exp. Cell Res.* 93:95–104.
 45. Venter G.G. 2008. *Astin Bull.* 37(2):345–364.
 46. Wagensberg J. 2000. *Biol. Philos.* 15:493-508.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

VIII. 1. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В ПЪЛЕН ТЕКСТ

1. **Georgieva M.**, Stoilov L. 2008. Assessment of DNA strand breaks induced by bleomycin in barley by the comet assay. Environmental and Molecular Mutagenesis; 49(5):381-7. **Impact factor 2.868/2009.**

2. **Georgieva M.**, Stoilov L., Rancheva E., Todorovska E., Vassilev D. 2010 Comparative analysis of data distribution patterns in plant comet assay. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 24 (4):2142-2148. **Impact factor 0.706 /2011.**

3. **Georgieva M.**, Gecheff K. 2013. Molecular cytogenetic characterization of a new reconstructed barley karyotype. Biotechnology & Biotechnological Equipment 27 (1): 3577 – 3582. **Impact factor 0.76 /2012**

VIII. 2. ПОСТЕРИ И ДОКЛАДИ, ПРЕДСТАВЕНИ НА НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Georgieva M.**, Manova V., Liu L., Stoilov L. 2008. Induction of DNA damage by Li-ions and gamma rays in barley genome. Постер, представен на FAO/IAEA International Symposium on induced mutations in plants, Виена, Австрия.

2. Manova V., **Georgieva M.**, B. Borisov, B. Stoilova, K. Gecheff, L. Stoilov. 2008. Genomic and gene-specific induction and repair of DNA damage in barley. Доклад, представен на FAO/IAEA International Symposium on induced mutations in plants, Виена, Австрия.

3. **Georgieva M.**, Stoilov L., Dimov G., Vassilev D. 2008. Comparison of statistical designs for comet assay. Постер, представен на Plant Genomics European Meeting Proc., 24-27 Септември, Албена, България, стр.159

4. **Georgieva M.**, Stoilov L. 2009. Estimation of repair capacity of barley genome for bleomycin-induced DNA damage under liquid holding conditions. Постер, представен на FEBS Workshop on 'Adaptation Potential in Plants', Виена, Австрия.

VIII. 3. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

1. Sasaki M.S. 2009. Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics. *International Journal of Radiation Biology*. 85(1):26- 47.
2. Cao Y., Ma J., Guo Ch., Li R., Yu J. 2009. Plant Comet Assay and Its Application on Environment Pollution Monitoring. *Asian Journal of Ecotoxicology*. 4(2).
3. Gichner T., Znidar I., Wagner E.D., Plewa M.J. 2009. The Use of Higher Plants in the Comet Assay . In: A. Dhawan and D. Anderson (Eds.) *The Comet Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry.
4. Patnaik A.R., Achary V. M.M., Panda, B.B. 2010. Comet assay to assess DNA damage and genotoxic stress in plants. In: B. K. Roy and B. R. Chaudhary (Eds.) *Plant Genome: Biodiversity, Conservation and Manipulation*, Narosa Publications, New Delhi: (2011), pp. 17–29.
5. Lagoda, P.J.L. Effects of Radiation on Living Cells and Plants. In: *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa (eds.) CABI, Oxfordshire UK, Cambridge USA, ISBN 978-92-5-107022-2. Chapter C11 (2012) 123–134.
6. Leitão J M. Chemical mutagenesis In: *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa (eds.) CABI, Oxfordshire UK, Cambridge USA, ISBN 978-1-78064-085-3. Chapter C12 (2012) 135-158.
7. Petriccione M., Ciniglia C. 2012. Comet assay to assess the genotoxicity of persian walnut (*Juglans regia* L.) husks with statistical Evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89:166–171.
8. Ahmad M.H., Bashir N., Ahmad H., M. Piah A. M., Abdul-Malek Z., Yusof F. 2013. Statistical analysis of electrical tree inception voltage, breakdown voltage and tree breakdown time data of unsaturated polyester resin. *J. Electr. Eng. Technol.* In press.