



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Физиология на Растенията и Генетика

Лаборатория „Геномна динамика и стабилност“

РАЛИЦА ГЕОРГИЕВА ГЕОРГИЕВА

ЕФЕКТИВНОСТ И ГЕНЕТИЧЕН КОНТРОЛ НА РЕПАРАЦИЯТА НА ДНК ПОВРЕДИ, ИНДУЦИРАНИ ОТ УЛТРАВИОЛЕТОВАТА РАДИАЦИЯ В ГЕНОМА НА ЕЧЕМИКА (*Hordeum vulgare* L.)

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: шифър 01.06.06 – „Генетика“

Научен ръководител

Проф. д-р Любомир Стоилов

Научен консултант

Гл. ас. д-р Василиса Манова

Рецензенти

Чл.кор.проф.д.б.н. Георги Русев

Проф. д-р Катя Георгиева

СОФИЯ

2017

Дисертационният труд е написана на 193 страници и включва 41 фигури и 14 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 390 източника, един от които на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения научен съвет на лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ към Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН, проведено на 30.03.2017г.

Изследванията по дисертационния труд са проведени основно в лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ при Институт по Физиология на Растенията и Генетика – БАН. Част от изследванията са проведени в Катедрата по Генетика на Силезийския университет, Катовице, Полша.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 29.06.2017 год. от 14 ч в заседателната зала на Института по Физиология на Растенията и Генетика – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл.21, на открито заседание на жури, избрано от Научния съвет на Института по Физиология на Растенията и Генетика – БАН с протокол №4/25.04.2017 и утвърдено със Заповед № 436/28.04.2017 на Директора на Института по Физиология на Растенията и Генетика – БАН.

Научното жури е в състав:

- *Вътрешни членове:*

Проф. д-р Любомир Стоилов (научен ръководител)

Проф. д-р Катя Георгиева

- *Външни членове:*

Чл.кор.проф.д.б.н. Георги Русев

Доц. д-р Геновева Начева

Доц. д-р Маргарита Пешева

Материали по защитата са на разположение на интересуващите се в Библиотеката и на Web-страницата на Института по Физиология на Растенията и Генетика – БАН, <http://www.bio21.bas.bg/ippg/>

Благодарности: Работата по настоящия дисертационния труд е проведена благодарение главно на финансовата подкрепа на **Проект BUL 15481 “Isolation and Characterization of Genes for Radiation Induced DNA Damage Repair in Barley”**, част от Координационна изследователска програма на МААЕ - Виена **“Isolation and Characterization of Genes Involved in Mutagenesis of Crop Plants”**

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:	3
БЛАГОДАРНОСТИ	3
I. ВЪВЕДЕНИЕ	4
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Моделна система	8
2. Методология	8
2.1. Облъчване на експерименталния материала с УВ-С светлина и репаративна инкубация в условия на осветяване с различен интензитет или на тъмно	8
2.2. Изолиране на тотална геномна ДНК и тотална РНК	8
2.3. Електрофоретичен анализ на индуцираните ЦПД в геномна ДНК при неутрални и денатуриращи условия	9
2.4. Пренос и хибридизация на ДНК	9
2.5. PCR-базирани методи за анализ на фотоповреди	10
a) <i>Long-Range PCR</i>	10
б) <i>Multiplex PCR</i>	11
2.6. Идентификация и секвениране на ечемичния ЦПД- фотолиазен ген	12
2.7. Обратна транскрипция комбинирана с полимеразна верижна реакция за анализ на транскрипционния профил на ечемичния ЦПД фотолиазен ген	13
a) <i>Обратна транскрипция</i>	13
б) <i>Полуколичествен RT-PCR</i>	13
в) <i>Количественият real-time PCR</i>	14
2.8. TILLING и EcoTILLING	14
2.9. Статистически методи за оценка на получените резултати ..	15
a) <i>Оценка на ЦПД в геномната ДНК на ечемика</i>	15
б) <i>Оценка на УВ-индуцираните повреди в индивидуални гени</i>	16
в) <i>Оценка на експресията на ечемичния ЦПД фотолиазен ген</i> ...	16
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	17
1. Честота на ЦПД в млади ечемични прорастъци след облъчване с УВ-С	17
2. Поправяне на ЦПД в тотална геномна ДНК от ечемик	18
2.1. Сравнително участие на светлинно-зависимите и тъмнинните репаративни механизми.....	18

2.2. Влияние на светлинните параметри върху ефективността на поправяне на ЦПД.....	22
2.3. Клъстерни ЦПД.....	25
2.4. Формиране и поправяне на ЦПД в рибозомалните гени на ечемика.....	26
3. PCR-базирани подходи за изследване на кинетиката на репарация в извънядрените геноми на ечемика.....	28
3.1. PCR амплификация на дълги ДНК фрагменти.....	28
3.2. Мултиплексен PCR.....	30
4. Репарация на ДНК фотопродукти в извънядрените ечемични геноми.....	30
4.1. Хлоропластен геном.....	31
4.2. Митохондриален геном.....	33
5. Клониране и секвениране на ЦПД-фотолиазния ген в генома на ечемика.....	35
6. TILLING и EcoTILLING на ечемичния ЦПД-фотолазен ген.....	37
7. Транскрипционен профил на ечемичния ЦПД-фотолазен ген.....	38
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
VII. ИЗВОДИ.....	43
VIII. ПРИНОСИ.....	45
IX. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА.....	46
X. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	48
1. Научни публикации в пълен текст.....	48
2. Принос към бази данни.....	48
3. Постери и доклади, представени на научни форуми.....	48
4. Проекти.....	49
5. Специализации.....	49

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

Кирилица

бд.	Базови двойки
гДНК	Геномна ДНК
eFreya	Етиолирана Freya
зFreya	Зелена Freya
кб.	Килобази
клЦПД	Клъстерни ЦПД
Мб.	Мегабаза
мт	Митохондриален
рДНК	Рибозомална ДНК
СС	Слънчева светлина
ТР	Тъмнинна репарация
УВ	Ултравиолетов/а/и
УВР	Ултравиолетова радиация
ФР	Фотореактивация
ФС	Флуоресцентна светлина
хл	Хлоропластен
ЦПД	Циклобутанов Пиримидинов Димер

Латиница

PCR	Полимеразна верижна реакция
RT-PCR	Полуколичествен PCR след обратна транскрипция
RT-qPCR	Количествен real-time PCR

БЛАГОДАРНОСТИ

Искренно благодаря на научния си ръководител проф. д-р Любомир Стоилов и на научната си консултантка гл.ас. д-р Василиса Манова за неоценимата помощ по време на изработването и изготвянето на настоящият дисертационен труд, за критичните бележки и творчески напътствия.

Благодаря на целия колектив на лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ за приятелската атмосфера и подкрепа.

Признателна съм на моята сестра Виолета Георгиева и родителите ми, които ме подкрепяха финансово и емоционално по време на изработването и написването на настоящата дисертация.

Специални благодарности на моите приятели Stefano & Stephan, които вярваха в моя успех, дори когато аз се съмнявах.

Сърдечно благодаря на Оги Досев, който ми показва, че светът е пълен с чудеса!

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В естествени и селскостопански условия, поради неподвижния си начин на живот, растенията често са изложени на неблагоприятните условия на околната среда, които могат да ограничат растежа, развитието и продуктивността им.

Слънцето е източник на енергия за растенията, необходим за осъществяване на фотосинтезата и важен сигнал от околната среда, който регулира техния растеж и развитие. От друга страна, в спектъра на слънцето се включват и ултравиолетовите (УВ) лъчи, които могат да увредят различни компоненти на растителната клетка в това число и ДНК. По принцип, растенията притежават висок потенциал да толерират вредните УВ лъчи, тъй като са способни да ги отразяват и/или абсорбират, въпреки това УВ радиацията (УВР) може да проникне в растителните клетки и да индуцира ДНК повреди, които да доведат до мутации и повишена геномна нестабилност. За растенията е характерно, че генетичната информация е закодирана в три различни генома, които се намират в ядрото, пластидите и митохондриите. Поддържането на целостта и интегритета на ДНК във всяка една от тези локации е от критично значение за тяхното съществуване. В тази връзка, изтъняването на озоновия слой през последните няколко десетилетия, благоприятства повишаването на количеството УВ лъчи, достигащи земната повърхност, чието последствие е засилване на вредното влияние на УВР върху растенията, което може да доведе до намаляване на продукцията на биомаса, морфологични и метаболитни промени, генетични промени, дори промяна в състава на видовете и тяхното разнообразие.

Основните УВ-индуцирани ДНК повреди са циклобутанови пиримидинови димери (ЦПД), чието присъствие в ДНК може да доведе до блокиране на важни клетъчни процеси като репликация и

транскрипция. За да се справят с тези увреждания, растенията са развили в процеса на еволюция набор от специфични репаративни механизми. В условия на осветеност чрез фотореактивация се катализира директното мономериране на ЦПД с помощта на ензима ЦПД-фотолиаза. На тъмно, обаче, се активира репарация с изрязване на нуклеотиди, за да бъдат отстранени тези деформиращи ДНК веригата повреди. Растенията могат да включат и хомоложната рекомбинация в отговор на повредите генерирани в ДНК под действието на високи дози УВР. Остатъчните фотоповреди могат да бъдат заобиколени чрез транслезионна репликация.

Ефективността и механизмите на репарация при растенията са много по-слабо проучени отколкото при прокариотите, дрождите, животните и човека. Въпреки това, в последното деситилетие се наблюдава значителен прогрес касаещ молекулярната характеристика на репаративните пътища и гените, подпомагащи тези процеси в икономически важни културни растения като ориз, спанак, домати, пшеница, ечемик и др. В тази връзка, въпреки интензивните изследвания провеждани с *Arabidopsis* и ориз, бъдещите изследвания трябва да се насочат към разширяване на обхвата на използваните моделни и културни растения, за да може да се направи по-цялостна и ясна характеристика на способността на растителния геном да преодолява биологичното влияние на различни генотоксини и да се адаптира към променящите се стресови условия на околната среда.

В настоящия дисертационен труд са изследвани индукцията и репарацията на повреди в тоталната геномна ДНК, ядрения и извънядрения геноми на ечемика след въздействие с УВ-С радиация, индуцираща ДНК фотоповреди. Направена е сравнителна характеристика на светлинно-зависимите и тъмнинните механизми, опериращи в млади ечемични растения, при поправянето на УВ-индуцирани ДНК повреди. Изследвано е влиянието на светлинните

параметри върху ефективността на репарация на ЦПД. Проучена е възможността за формиране и поправяне на клъстерни ЦПД в 6-дневни ечемични прорастъци. Идентифициран и секвениран е геномен ДНК фрагмент обхващащ ЦПД-фотолиазния ген при ечемика. Анализиран е транскрипционния профил на ЦПД-фотолиазния ген при ечемични прорастъци след излагането им на слънчева светлина с висок интензитет или облъчвани с УВ-С радиация.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел на дисертационния труд

Основна цел на настоящия дисертационен труд е да се анализират молекулярните механизми, обуславящи ефективността на репарация и генетичния контрол на индуцираните от ултравиолетовата радиация ДНК повреди в генома на ечемика.

2. Основни експериментални задачи:

1. Изследване на вида и ефективността на репаративните механизми, отстраняващи циклобутановите пиримидинови димери, индуцирани в геномната ДНК на ечемика след облъчване на листни прорастъци с УВ-С радиация.

2. Анализ на ген-специфичната репарация на УВ-С индуцираните ДНК повреди в генома на ечемика. Сравнителен анализ на ефективността на светлинните и тъмнинните репаративни механизми в хлоропластния, митохондриалния и ядрения ечемични геноми.

3. Идентификация и характеризиране на гена кодиращ ЦПД-фотолиазата в генома на ечемика. Анализ на ефекта на светлината и УВ-С лъчите върху транскрипционния профил на гена при етиолирани и зелени растения.

4. Определяне на участъци от ечемичния ЦПД-фотолиазен ген, подходящи да бъдат подложени на TILLING. Претърсване на полска мутагенизирана TILLING популация и български гама-реконструирани кариотипове ечемик за наличие на индуцирани или естествени мутации в тези участъци.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Моделна система

Като основен експериментален материал в настоящия дисертационен труд са използвани 6-дневни зелени и етиолирани прорастъци двуреден пролетен ечемик (*Hordeum vulgare*, L.) от линия Freya. Проведени са и изследвания с гама-реконструирания кариотип T-1586 (Gecheff, 1978).

Като експериментален материал за TILLING са използвани полска линия пролетен ечемик Sebastian, като контрола и 3840 ДНК изолати от листата на M2 поколението на растения от мутагенизираната популацията HorTILLUS (*Hordeum vulgare*-TILLING-University of Silesia).

Като експериментален материал за EcoTILLING е използвана българска колекция от гама-реконструирания кариотипове ечемик T-1586, T-35, D-29/46, T-29, T-46, PK 19-88, PK-88 и I-19 (създадени в Института по Генетика от проф. К. Гечев) и линия Freya като контрола.

2. Методология

2.1. Облъчване на експерименталния материала с УВ-С светлина и репаративна инкубация в условия на осветяване с различен интензитет или на тъмно

Млади ечемични растения бяха облъчвани с дози УВ-С вариращи от 0.5 до 50 кJ/m², след което бяха оставяни да се възстановят при различни светлинни и/или тъмнинни условия и кинетиката на поправяне на ЦПД беше проследявана в интервали от 0.5 до 120 часа след облъчването.

При експериментите за анализ на генната експресия, 6-дневни етиолирани и зелени ечемични прорастъци бяха облъчвани с 5 кJ/m² УВ-С и оставени за репаративна инкубация на слънчева светлина.

2.2. Изолране на тотална геномна ДНК и тотална РНК

Тотална ДНК беше изолирана с "DNeasy plant mini kit" (Qiagen) с модификации, засягащи клетъчния лизис (при 55°C за 30 мин.).

За TILLING и EcoTILLING експериментите ДНК екстракцията беше проведена по модифициран "micro CTAB" метод на Doyle and Doyle (1987).

Тотална РНК беше изолирана с „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen).

2.3. Електрофоретичен анализ на индуцираните ЦПД в геномна ДНК при неутрални и денатуриращи условия

ЦПД, индуцирани на ниво геномна ДНК, бяха анализирани чрез конвенционална алкална гел–електрофореза, както е описано в Манова (2007).

При експериментите за анализ на репарацията на ниво извънядрени геноми беше използвана конвенционална неутрална агарозна гел–електрофореза.

ДНК и при двата метода беше визуализирана и фотографирана под УВ със система за фотодокументация (GE Healthcare Bio-Sciences AB) с дигитална камера (Canon PowerShot A640).

2.4. Пренос и хибридизация на ДНК

Анализът на ЦПД в отделните рибозомални повтори беше извършен чрез Southern блотинг на EcoRI обработени ДНК проби, които бяха третирани (+) или нетретирани (-) с ензимът T4EndoV.

Пренасянето на ДНК от агарозните гелове върху найлонова мембрана Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) беше извършвано посредством капилярен пренос при алкални условия.

Като хибридизационна сонда в проведените експерименти беше използван ДНК фрагмент с дължина 893 базови двойки (бд.) от ечемичния ген за 18S рРНК (**Forward:** AAACGGCTACCACATCCAAG; **Reverse:** AACTAAGAACGGCCATGCAC).

Нерадиоактивният хибридизационен анализ беше провеждан както е описано в Manova et al. (2006). Белязането, хибридизацията и

детекцията беше извършена с „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche Holding AG). След изсушаване детектираните мембрани бяха сканирани с дигитален скенер HP Scanjet 3770 и подложени на денситометричен анализ.

2.5. PCR-базирани методи за анализ на фотоповреди

a) Long-Range PCR

Long-Range PCR е вариант на стандартната полимеразна верижна реакция, при който се размножават ДНК фрагменти с относително по-голяма дължина, за да се повиши чувствителността при анализа на ген-специфична ДНК репарация.

В проведените експерименти бяха използвани фрагменти от хлоропластните (хл) гени *groC2* (кодиращ РНК полимераза β -субединица) и *psaB/psaA* (фрагмент *psaB-A*, включващ части от тези два гена, кодиращи субединици на фотосистема I), и митохондриалният (мт) ген *grs2* (кодиращ рибозомален протеин S2). Освен дългите ДНК фрагменти от изследваните гени, бяха намножени и къси контролни фрагменти, при които вероятността за увреждане е значително намалена. За целта бяха конструирани праймери амплифициращи къси фрагменти от ечемичния актинов ген, хл гени *psaA* и *groC2*, както и от мт ген *grs2*. Праймерните двойки са обобщени в Таблица 1.

Таблица 1.

Праймери	Forward	Reverse
<i>groC2</i> гена (4301 бд)	GGGCCAATCTGGTCTTT CAT	CTTGTCTTGTGGGGA ACGAT
<i>psaB-A</i> гените (4300 бд)	ACAATGGAAAGAGCCA CAGG	CGGCCATTTCTCAAG AACAC
<i>grs2</i> гена (~3400 бд)	GTGCCTCATCGAGGATT GTT	AGTACGGACTGAGGG GGTCT
малък фрагмент от <i>grs2</i> гена (305 бд)	GTGCCTCATCGAGGATT GTT	CCCGGATCATTCTTA GAGCA
малък фрагмент от <i>groC2</i> гена (238 бд)	GATCTGGTGGGAATTGG GAGA	CTTGTCTTGTGGGGA ACGAT
малък фрагмент <i>psaA</i> гена (305 бд)	CCCCACCTACATCACCA TTC	CGGCCATTTCTCAAG AACAC

малък фрагмент от актиновия ген (~370 бд)	GCCACACTGTTCCAATC TATGA	TGATGGAATTGTATG TCGCTTC
--	----------------------------	----------------------------

Всеки фрагмент от ген беше размножаван при специфичен брой и параметри на циклите на PCR реакцията (Таблица 2). Дигитализираните гелове бяха обработени с денситометричната програма за определяне на относителните количества на PCR продуктите.

Таблица 2.

Програма за groC2 фрагмента	t°	време	Програма за psaB- А фрагмента	t°	време
Начална денатурация	93°C	5 мин.	Начална денатурация	93°C	5 мин.
Брой цикли (20)			Брой цикли (20)		
Денатурация	93°C	40 сек.	Денатурация	93°C	25 сек.
Хибризация	60°C	40 сек.	Хибризация	60°C	30 сек.
Удължаване	68°C	5 мин.	Удължаване	68°C	5 мин.
Крайна стъпка	4°C	∞	Крайна стъпка	4°C	∞
Програма за grs2 фрагмента	t°	време	Програма за къси фрагменти	t°	време
Начална денатурация	93°C	5 мин.	Начална денатурация	93 °C	5 мин.
Брой цикли (22)			Брой цикли (20)		
Денатурация	93°C	40 сек.	Денатурация	93 °C	40 сек.
Хибризация	65°C	40 сек.	Хибризация	60-65 °C	40 сек.
Удължаване	72°C	5 мин.	Удължаване	68 °C	1 мин.
Крайна стъпка	4°C	∞	Крайна стъпка	4 °C	∞

б) Multiplex PCR

Този метод позволява размножаване на повече от една ДНК последователност в една и съща PCR реакция чрез добавянето на повече от една двойка праймери в реакционната смес.

Таблица 3.

Програма Multiplex PCR	t°	време
Начална денатурация	93 °C	5 мин.
Брой цикли (15-20)		
Денатурация	93 °C	40 сек.
Хибризация	60 °C	40 сек.
Удължаване	68 °C	5 мин.
Крайна стъпка	4 °C	∞

Фрагментите от таргетните гени бяха размножавани при

специфичен брой и параметри на циклите на PCR реакциите (Таблица 3).

2.6. Идентификация и секвениране на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген

Праймерите и параметрите на PCR реакцията за амплифициране на геномен фрагмент от предполагаемия ЦПД-фотолиазен ген на ечемика са обобщени в Таблица 4.

Таблица 4.

Дегенерирани праймери AC2: GTIGAYGCICAYAAAYGTIGTICC AC4R: CATRAAICCRTGCATYTTICC		
Програма	t°	време
Начална денатурация	93 °C	5 мин.
Брой цикли (45-50)		
Денатурация	93 °C	1 мин.
Хибридизация	50 °C	1 мин.
Удължаване	68 °C	1 мин. 40 сек.
Крайна стъпка	4	∞

Полученият фрагмент беше клониран с „CloneJET PCR Cloning kit“ (Thermo Fisher Scientific) по протокола на производителя за клониране с тъпи краища (Blunt-End Cloning Protocol). Трансформацията беше извършвана с „TransformAid Bacterial Transformation kit“ (Thermo Fisher Scientific). Идентифицирането на рекомбинантните колонии беше направено чрез колонен PCR. ДНК плазмиди бяха изолирани с „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Biosciences). Пречистените плазмиди и PCR продукт на фрагмента, наможен с дегенерираните праймери бяха изпратени за секвениране (Microsynth AG).

Конструирани бяха шест двойки припокриващи се праймери, които да обхванат цялата геномна последователност на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген. След оптимизация на PCR условията бяха намножени пет фрагмента, които впоследствие бяха секвенирани. Праймерите и условията за амплифицирането им са обобщени в Таблица 5а и 5б.

Таблица 5а.

Двойки праймери:	Двойки праймери:
PHR1 F TTCCCTCCCTCTTCTTTCGT	PHR 4 F AGAATGGACCACTGGACCTG
PHR1 R AGCCACACTGGCAGCATC	PHR 4 R GAGGCCACATATAGACCACA
PHR2 F CTGGTCGCCGACTTCTCAC	PHR 5 F GCTATGTTGGTTGCATGTGG
PHR2 R CTAAGATGGCGACGCTTTT	PHR 6 R ATCATGGAGCGAAAGAGCAT
PHR3 F GCTTGAGAATGCAAAAACAGC	
PHR3 R GAAAGTGCTTCTTCAGGTCCA	

Таблица 5б.

Програма	t°	време	Програма	t°	време
PHR1			PHR3/4/5/6		
Начална денатурация	94 °C	5 мин.	Начална денатурация	94 °C	5 мин.
Брой цикли (45)			Брой цикли (45)		
Денатурация	93 °C	1 мин.	Денатурация	93 °C	40 сек.
Хибридизация	57 °C	1 мин.	Хибридизация	57 °C	1 мин.
Удължаване	68 °C	1.5 мин.	Удължаване	72 °C	2 мин.
Крайна стъпка	4	∞	Крайна стъпка	4	∞
Програма PHR2					
Начална денатурация	94 °C	5 мин.			
Брой цикли (45)					
Денатурация	93 °C	1 мин.			
Хибридизация	60 °C	1 мин.			
Удължаване	68 °C	1.5 мин.			
Крайна стъпка	4	∞			

2.7. Обратна транскрипция комбинирана с полимеразна верижна реакция за анализ на транскрипционния профил на ечемичния ЦПД фототиазен ген

В тези изследвания беше използвана линия Freya като 6-дневни етиолирани и зелени ечемични прорастъци бяха облъчвани с 5 kJ/m² УВ-С и оставяни за репарация на слънчева светлина (СС) с висок интензитет.

а) Обратна транскрипция

Обратната транскрипция беше извършена с „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific).

б) Полуколичествен RT-PCR

Полуколичествения RT-PCR беше осъществен с *Taq* ДНК полимера (Thermo Fisher Scientific) и комплементарни ДНК получени

при обратната транскрипция.

в) Количественият real-time PCR

Като прицелен ген беше използван идентифицирания от нас ечемичен ЦПД-фотолиазен ген (KC345035), от който беше намножен фрагмент с дължина 180 бд (**Forward:** AGTCCCAAGTCAGTGGATGC; **Reverse:** AAGCTGCTCCCTCGTGTAАА). Като референтен ген беше използван ечемичният 18S рРНК ген (AY552749.1), от който беше намножен 118 бд. фрагмент (**Forward:** CCTGCGGCTTAATTTGACTCA; **Reverse:** AACTAAGAACGGCCATGCAC).

За провеждане на RT-qPCR беше използван „Maxima SYBR Green qPCR Mater Mix (x2)“ (Thermo Fisher Scientific) и PikoReal Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Оптималните условия за амплификация са описани в Таблица 6.

Таблица 6.

Програма RT-qPCR	t°	време
Начална денатурация	95°C	10 мин.
Брой цикли (40)		
Денатурация	95°C	15 с.
Хибридизация	60°C	30 с.
Удължаване	72°C	30 с.
	55-95°C с	
Крива на топене	нарастване на температурата	
	0.5°C	

2.8. TILLING и EcoTILLING

За целите на TILLING и EcoTILLING скрийнинга бяха конструирани 3 двойки ген-специфични праймери на базата на ДНК последователността на идентифицирания и секвениран от нас ечемичния ЦПД-фотолиазен ген с помощта на онлайн базираната програма Primer3. Праймерите са обобщени в Таблица 7.

Таблица 7.

Фрагмент PHR_1a (1172 бд.)	
Forward	5'- TAACGTTTCGCTGACAGGTG
Reverse	5'- CCTCCTGCAATCCAAGGTAA

Фрагмент PHR_1b (1288 бд.)	
Forward	5'- CTCCTTACCGGTACGCCTTT
Reverse	5'-CCTCCTGCAATCCAAGGTAA
Фрагмент PHR_2 (537 бд.)	
Forward	5'- CAGGGACCCCAATGGCTATG
Reverse	5'- ATCATGGAGCGAAAGAGCAT

Тъй като фрагментите PHR_1a и PHR_1b показаха неспецифики в хода на по-нататъшната работата, то TILLING и EcoTILLING беше проведен само с фрагмент PHR_2.

Като цяло TILLING протоколът може да бъде разделен на първично и вторично претърсване, които включват едни и същи стъпки. Първата стъпка от TILLING методиката е формиране на хетеродуплекс между контролната и изследваните ДНК проби. Следващата стъпка е електрофорезата на полиакриламиден гел в 4300 DNA Analyzer апарат (Li-COR Biosciences). Дигиталните изображения на получените акриламидни гелове бяха анализирани, при което пуловете дали позитивен сигнал бяха подложени на вторично претърсване.

2.9. Статистически методи за оценка на получените резултати

a) Оценка на ЦПД в геномната ДНК на ечемика

Приложен е „Number Avarage Lengh Analis“ (Sutherland *et al.*, 1999; 2006), където честотата на скъсванията в ДНК [Ф] е изчислена въз основа на средната дължина на популациите съгласно уравнението

$\phi = \langle L \rangle_{n,+}^{-1} - \langle L \rangle_{n,0}^{-1}$, където $\langle L \rangle_{n,+}$ е средната дължина на третираната проба и

$\langle L \rangle_{n,0}$ е средната дължина на не-третираната контрола. $\langle L \rangle_n$ на

всяка ДНК проба е изчислена чрез $\frac{\langle L \rangle_n}{\langle L \rangle_m} = \frac{x_0 - x}{x - x_\infty}$, където x е позицията на

молекулите с дължина $\langle L \rangle_n$, x_0 и x_∞ са местоположенията върху гела на „хипотетични“ молекули със съответно „нулева“ и „безкрайна“ дължина,

$\langle L \rangle_m$ е дължината на молекулите, които са мигрирали до позиция, равна на половината от разстоянието между χ_0 и χ_∞ .

Честотата на първично индуцираните скъсвания в ДНК е приета за 100% увреждане и последващата репарация е оценявана на тази база.

б) Оценка на УВ-индуцираните повреди в индивидуални гени

Честотата на ДНК повредите N от всяка репаративна точка бяха изчислявани по уравнението: $N = -\ln(I^{UV}/I^C)$, където I^{UV} представлява интензитета на светене на PCR фрагмента, намножен от ДНК от облъчените проби, а I^C представлява интензитета на светене на съответния фрагмент в ДНК от контролната проба. Репарацията на УВ фотопродуктите беше определена като процент нерепарирани [F_{unr}] повреди в ДНК за всяка от репаративните точки, изразяван чрез съотношението на броя повреди в един фрагмент от ДНК, останали след репаративната инкубация [Nr], към броя първоначално индуцирани повреди в същия фрагмент [N_0]: $F_{unr} = (Nr / N_0) \times 100$

в) Оценка на експресията на ечемичния ЦПД фотолиазен ген

RT-qPCR анализът е проведен, за да се определят относителните нива на експресия на ЦПД фотолиазния ген като степента на изменение в транскрипционните нива е изчислена по метода на Pfaffl (2001).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

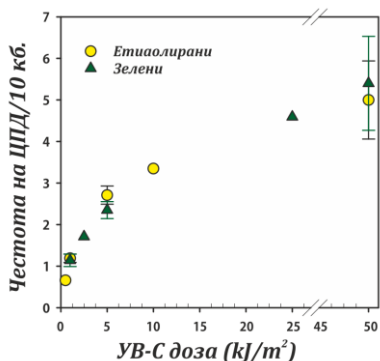
1. Честота на ЦПД в млади ечемични прорастъци след облъчване с УВ-С

За да се изследва кинетиката на поправяне на ЦПД в млади зелени и етиолирани ечемични прорастъци, е необходимо да се изчисли количеството на индуцираните фотопродукти в геномната им ДНК. Честотата на ЦПД е изразена като брой повреди на 10 килобази (кб.) от ДНК. В рамките на обхвата на изследваните дози УВ-С ($0.5\text{--}10\text{ kJ/m}^2$), при които се индуцират повреди в рамките на ~ 70 до ~ 300 ЦПД на мегабаза (Мб.), беше установено, че броят на ЦПД нараства почти линейно с нарастването на приложената доза (Фиг.1.).

Най-ниската УВ-С доза от 0.5 kJ/m^2 , използвана при нашите експериментални условия, генерира 0.66 ЦПД на 10 кб. от геномната ДНК (гДНК) в етиолирани листа от ечемик, докато по-високата доза от 1 kJ/m^2 генерира $1.19^{\pm 0.1}$ и $1.14^{\pm 0.15}$ ЦПД/10 кб. при етиолирани и зелени листа, съответно. Освен това, при облъчване с УВ-С радиация с доза от 5 kJ/m^2 се генерират $2.71^{\pm 0.22}$ ЦПД на 10 кб. в етиолирани листа и малко по-малко – $2.35^{\pm 0.2}$ ЦПД на 10 кб. в зелени ечемични листа. Като цяло резултатите показаха сравними стойности на честотата на димерите в зелените и етиолираните листа като тенденцията се запази и след облъчване с 50 kJ/m^2 УВ-С, при което се индуцират $5^{\pm 0.94}$ и $5.4^{\pm 1.13}$ ЦПД/10 кб. от гДНК при ечемични прорастъци, съответно отглеждани на тъмно и на светло.

При ориза е установено, че УВ-В дози от порядъка на $2.5\text{--}12.5\text{ kJ/m}^2$ генерират около 10 - 50 ЦПД/Мб. (Hidema et al., 2001). Приблизително 10 пъти по-голямото количество получени ЦПД в нашите изследвания могат да се дължат на характеристиките на експерименталния материал или източника на УВ. От друга страна, нашата оценка на ЦПД повредите, получени при облъчване с доза от 5

kJ/m^2 (~250 на Мб.), показва аналогична честота на повредите измерени с HPLC метода при *Arabidopsis* при облъчване със сравними дози УВ-В (Dany et al., 2001), което предполага, че тези нива на ЦПД не са надценени.



Фиг.1. Честота на индуцираните ЦПД в ечемичния геном след въздействие с повишаващи се дози УВ-С радиация.

2. Поправяне на ЦПД в тотална геномна ДНК от ечемик

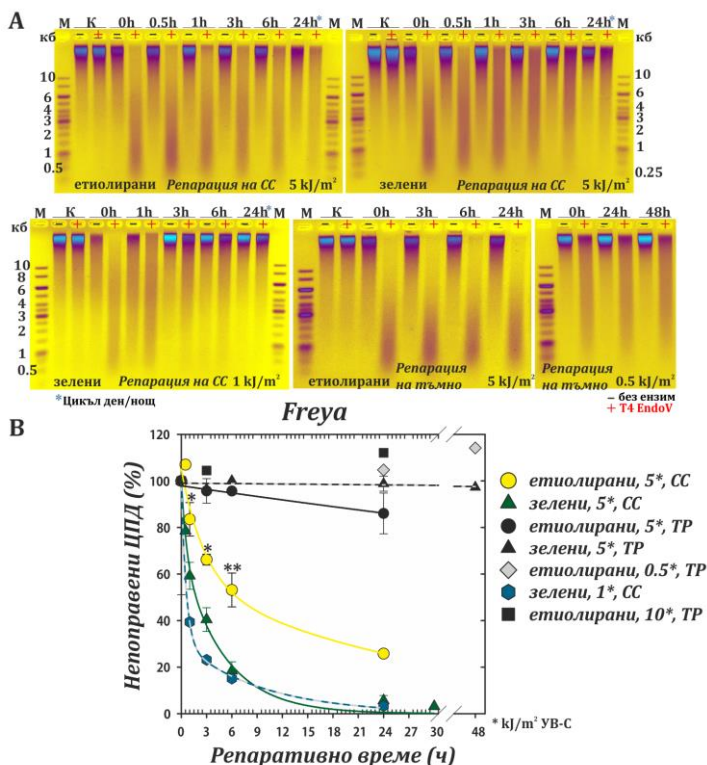
2.1. Сравнително участие на светлинно-зависимите и тъмнинните репаративни механизми

6-дневни зелени и етиолирани ечемични прорастъци от линиите Freya и T-1586 бяха облъчвани с УВ-С лъчи и впоследствие подложени на репаративна инкубация при условия на осветяване със СС или при липса на светлина.

При линията Freya, абсолютните честоти на ЦПД измерени веднага след облъчването бяха $2.91^{+0.13}/10\text{кб.}$ при етиолираните растения (eFreya) и $2.64^{+0.6}/10\text{кб.}$ при зелените растения (zFreya); фоновите повреди при необлъчените контролни растения бяха 0.02 и 0.03/10кб., съответно.

Получените резултати от репарацията на СС показаха 78.6%, $59.3^{+5.8}\%$, $40.5^{+5.1}\%$ и $18.4^{+3.9}\%$ непоправени ЦПД в зелените прорастъци след 0.5, 1, 3 и 6 часа. В етиолираните листа измерените нива на ЦПД при същите интервали на възстановяване бяха калкулирани съответно

като 107%, $83.5^{\pm 7.2}\%$, $66.2^{\pm 2.3}\%$ и $53.2^{\pm 7.2}\%$ (Фиг.2.).



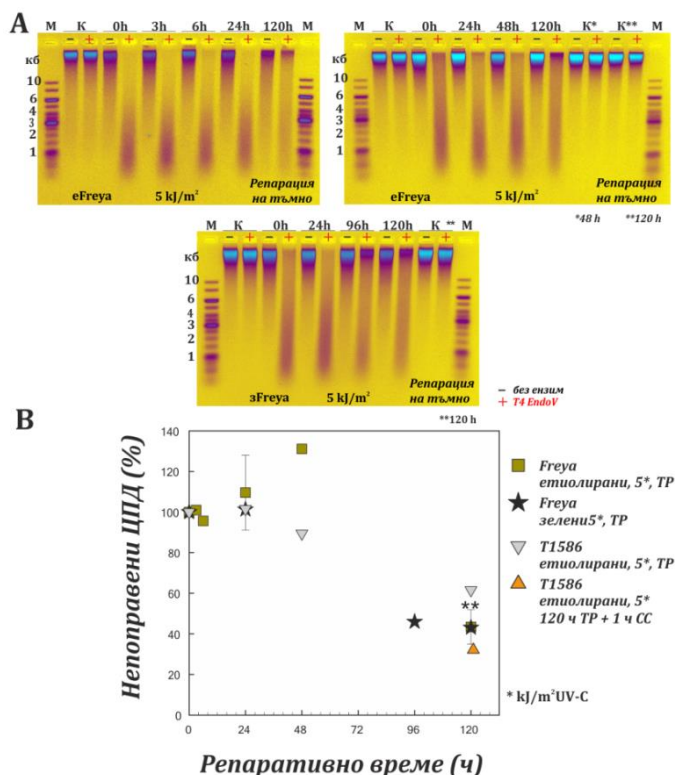
Фиг.2. Сравнителна ефективност на репарацията на ЦПД в тотална гДНК вследствие действието на светлинни и тъмнинни репаративни механизми. Разлики в репаративния капацитет на етиолираните и зелени растения: *статистически значими при $P < 0.05$ (t-test); ** статистически значими при $P < 0.01$ (t-test)

Фоторепарацията (ФР) на ЦПД в етиолирани прорастъци очевидно протича много по-бавно, отколкото в зелените, като разликата е ясно забележима дори само след 30 мин. репаративна инкубация. Разликата в репаративната кинетика на ЦПД се запази и до 24 часа след облъчването, когато около 25% (0.53 ЦПД/10кб.) нерепарирани ЦПД все още присъстваха в гДНК на етиолираните прорастъци, докато в гДНК на зелените растения почти всички ЦПД бяха вече елиминирани. В допълнение, наличие на непоправени увреждания все пак беше измерено

в зелените ечемични прорастъци дори след по-продължителни периоди на възстановяване като 24 ч. и 30 ч. [съответно $5.6^{\pm 2.2}\%$ (0.15 ЦПД/10кб.) и 3.15% (0.08 ЦПД/10кб.)] (Фиг.2.).

Интензивната УВР използвана в нашите изследвания (УВ-С доза от 5 kJ/m^2) позволява ясно разграничаване между формирането на ЦПД и кинетиката на фоторепаративните механизми работещи за тяхното премахване. Нашите резултати ясно показват, че облъчените 6-дневни ечемични прорастъци, оставени за репаративна инкубация на СС, притежават много добър капацитет да отстраняват големи количества ЦПД, дори такива, които потенциално водят до увреждане на ечемичния геном на ниво индивидуален ген. От друга страна, остатъчните повреди, детектируеми след по-дълъг период на инкубация подкрепят концепцията, че някои части на генома са по-неподатливи на поправяне и следователно при растенията най-вероятно са се развили механизми, позволяващи им да толерират ЦПД, когато те са в ниски количества в генома (Britt, 1995).

Първоначално, оценката на премахване на ЦПД чрез тъмнинните репаративни механизми (ТР) за линия Freya беше проведена в рамките на 48 часа при пълна тъмнина. Абсолютните честоти на ЦПД измерени веднага след облъчването бяха $4.27^{\pm 0.8}/10\text{кб.}$ (eFreya) и $1.98^{\pm 0.5}/10\text{кб.}$ (zFreya); фоновите повреди при необлъчвани контролни растения бяха 0.02 и 0.04/10кб., съответно. Данните показаха, че в eFreya оставени при пълна тъмнина за 3, 6 и 24 часа, процента на непоправените ЦПД е $95.7^{\pm 5.3}$, 95.65 и $86^{\pm 8.7}\%$, съответно. Стойностите, получени при zFreya за същите репаративни интервали на практика бяха същите - 96.5, 100.1 и $98.8^{\pm 3.2}\%$ непоправени ЦПД. По-продължителната инкубация на тъмно в рамките на два дни не доведе до някакво значително намаляване на нивата на фотоповредите (97% непоправени ЦПД след 48 часа репарация) (Фиг.2.).



Фиг.3. Намаление на честотата на ЦПД в ечемични прорастъци след продължителна инкубация на тъмно. Разлики между количеството ЦПД измерено в етиолираните растения веднага след UV облъчването и след 120 часа тъмнинна инкубация: ** статистически значими при $P < 0.01$ (t-test).

Когато обаче растенията (зелени и етиолирани) бяха инкубирани за по-дълги периоди при пълна тъмнина (до 5 дни) количествата на първоначално индуцираните ЦПД в гДНК бяха значително редуцирани (Фиг.3.). Количествата на първоначално индуцираните ЦПД ($3^{±1.1}/10\text{кб.}$), които бяха на практика непроменени еFreya след 24 часа ($109.6^{±18.5}\%$), бяха редуцирани до $43.4^{±8.5}\%$ ($1.3/10\text{кб.}$) след 120 часа инкубация на тъмно. Тези данни показват, че може би други репаративни механизми се включват в процеса на възстановяване на геномния интегритет в ечемичните листа отглеждани на тъмно, но тяхното активиране изисква

по-дълъг инкубационен период.

В съгласие с резултатите получени при линия Freya относно ТР, при ечемичните прорастъците от кариотип T-1586, оставени за възстановяване на тъмно до два дена след облъчването, в началните часове липсваше репарация (след 6 часа) и беше отчетено много малко намаляване на количеството на ЦПД като около 80% от ЦПД все още бяха останали непоправени след 24 и 48 часа, съответно, в етиолираните и зелените ечемични листа. След 120 часа репаративна инкубация на тъмно в етиолираните растения количеството на нерепарирани ЦПД намаля до около 60% (Фиг.3.).

Дали установеното значимо намаляване на ДНК повредите след 5 дни тъмнинна инкубация на облъчените прорастъци, както при отглежданите на тъмно, така и при отглежданите на светло растения е в резултат на активирането на тъмнинните репаративни пътища или по-скоро представлява така нареченото „разреждане на димерите” дължащо се на ДНК репликация, осъществена от транслезионни полимерази, е въпрос на бъдещи изследвания. В тази връзка наскоро беше демонстрирано, че заобикалянето на непоправени ЦПД, зависимо само от протичащата ДНК синтеза, е много ефикасен, но склонен към грешки механизъм и следователно отговорен за високото ниво на мутации при растенията (*Holá et al., 2015*). Също така е показано, че ендоредупликацията може да представлява алтернативна стратегия за растенията, позволяваща адаптирането им към високи нива на УВ-В радиация (*Gegas et al., 2014*). Трябва да се отбележи, обаче, че в настоящите експерименти не беше наблюдавано увеличаване на размера на листата на облъчените ечемични прорастъци по време на 5-дневния интервал на тяхното възстановяване.

2.2. Влияние на светлинните параметри върху ефективността на поправяне на ЦПД

Беше проучен капацитетът на младите ечемични прорастъци да

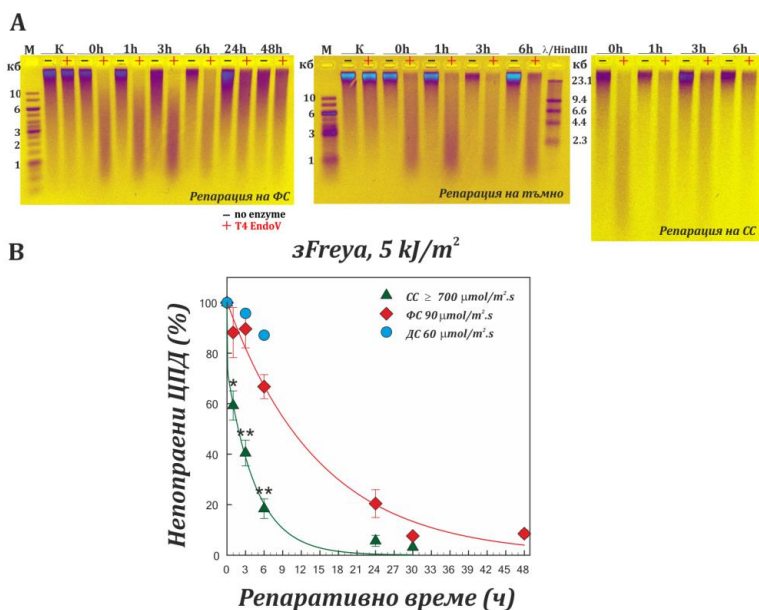
активират светлинно-зависимо поправяне на ЦПД във връзка с интензитета на светлината и/или нейното качество. За целта облъчени и контролни прорастъци бяха изложени на изкуствена флуоресцентна светлина (ФС) с нисък интензитет или на естествена СС с висок интензитет.

Абсолютната честота на ЦПД, измерена веднага след облъчването, беше $2.02^{+0.5}/10$ кб. (зFreya). Резултатите от репарацията на ФС с нисък интензитет показаха $88.2^{+9.9}\%$, $89.6^{+7.5}\%$, $66.7^{+4.8}\%$, $20.4^{+5.5}\%$, и 7.6% непоправени ЦПД в зелените прорастъци след 1, 3, 6, 24 и 30 часа инкубация. Очевидно е, че при условията на продължително осветяване със светлина с нисък интензитет ЦПД се поправят по-бавно отколкото при излагане на СС с висок интензитет (Фиг.4.).

Нашите резултати показаха, че ефективността на ЦПД репарация в ечемичните листни прорастъци, както в етиолираните така и в зелените, е изключително висока, когато растенията са оставени да се възстановяват на директна СС с висок интензитет на ФАР. От друга страна, при растенията, които бяха оставяни да се възстановяват при ФС с умерен или нисък интензитет, ЦПД бяха премахвани значително по-бавно. Следователно нашите данни са в съгласие с вече предположените разлики, които вероятно съществуват в молекулярния отговор на растителния геном към УВ-В облъчване в условията на естествена слънчева светлина и при осветяване с изкуствена светлина (Casati et al., 2011).

Проведените наскоро изследвания показват, че намаляването на интензитета на ФАР с около 25% от този на околната среда, не успява да провокира при ечемика ефективен защитен физиологичен отговор срещу УВ, докато високи нива на ФАР могат да облекчат до известна степен УВ-свързаните негативни ефекти (Klem et al., 2012). Тези резултати напълно са в съгласие с нашите данни за молекулярния отговор на ечемичните прорастъци към УВ-С радиация оценен на ниво гДНК

репарация. Следователно капацитетът на растителния геном да фоторепарира УВ индуцираните ЦПД вероятно се подценява, ако се измерва само при излагане на светлина с нисък интензитет.



Фиг.4. Относителна ефикасност на геномната ЦПД фоторепарация при облъчване на зелени прорастъци с видима светлина с различен интензитет и спектър. Разлики в репаративните кинетики между зелените растения изложени на СС с висок интензитет или на ФС: *статистически значими при $P < 0.05$ (t-test); ** статистически значими при $P < 0.01$ (t-test).

Наблюдаваното забавяне в репаративната кинетика при ФС може да бъде също така зависимо и от нейния спектър на излъчване. Растителната фотолиаза абсорбира фотони от синята/УВ-А част на спектъра, но максималната фоторепаративна активност е наблюдавана в УВ-А областта (Britt, 1999). В котиледони от краставица максимума на фоторепарацията на ЦПД *in vivo* е отчетена при 375 nm, докато при дължина на вълната над 425 nm е забелязано съществено намаляване на елиминирането на ЦПД (Takeuchi et al., 1998). При *Arabidopsis* поправянето на ЦПД е по-ефикасно, когато УВ-А присъства в илюминиращата светлина (Dany et al., 2001). Също така е показано, че

само УВ-А в слънчевата радиация може да бъде достатъчна за фоторепарацията на ЦПД в краставични котиледони (*Takeuchi et al., 2000*).

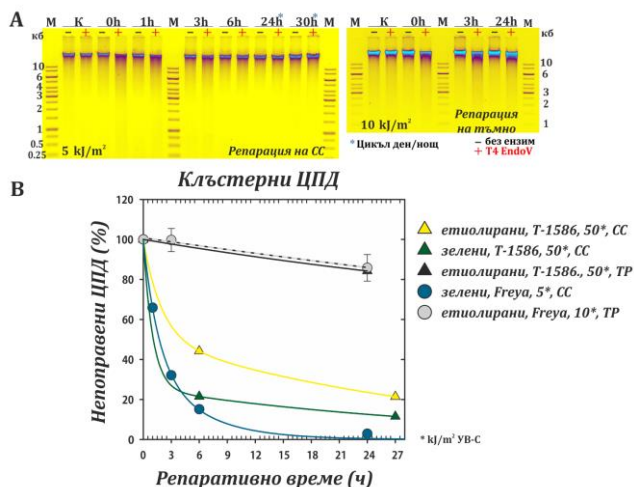
2.3. Клъстерни ЦПД

Резултатите показаха, че клъстерните ЦПД (клЦПД) са трудно доловими чрез приложената методология след облъчване с ниска доза като 1 kJ/m^2 , но все пак бяха визуализирани и измерими след третиране с умерени дози от 5 и 10 kJ/m^2 УВ-С. След прилагането на доза от 50 kJ/m^2 беше дори изненадващо относително високото ниво на ЦПД, съществуващо под формата на клъстери (1.6 и 1.7 клЦПД/10 кб. в етиолираните и зелените прорастъци, съответно). Това показва, че при нашите експериментални условия, от всичките измерени ЦПД в гДНК на ечемика, тези, организирани в клъстери, представляват една значима фракция (при 5 kJ/m^2 клЦПД са около 10% от всички измерени ЦПД).

Кинетиката на отстраняване на клЦПД чрез фоторепаративния механизъм се оказва подобна на тази, измерена при общото количество ПД. При растения, възстановяващи се в условията на липса на светлина, не бе измерено намаляване на клЦПД във времеви интервал от 3 часа, а листните проби след 24 часа инкубация на тъмно съдържаха все още около 85% ЦПД - резултат, който ясно показва неефективна тъмнинна репарация на ЦПД (Фиг.5.).

Като цяло клЦПД може да не са сериозна пречка поне за фоторепаративните механизми. Въпреки това все още не е известно дали пълното отстраняване на такива клЦПД би било по-трудно за тъмнинните репаративни механизми, както е предположено за оксидативните клъстерни повреди, предизвикани от ЙР. Може да се спекулира, че в случаите на значително увреден геном, чрез използването предимно на „*etgog-free*“ ФР и минимизирайки участието на склонните към грешки тъмнинни репаративни механизми при отстраняването на клЦПД, ечемичните прорастъци могат да избегнат

формирането на допълнителни верижни скъсвания в техния геном.



Фиг.5. Клъстерни ЦПД в *in vivo* облъчени ечемични прорастъци.

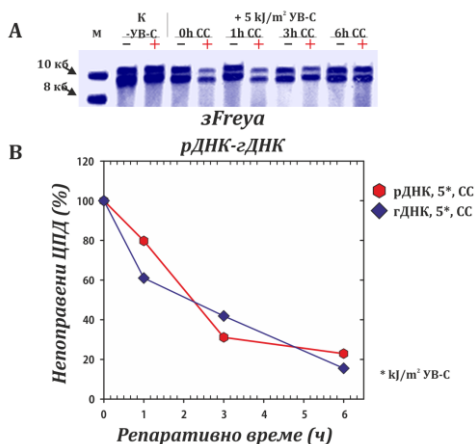
2.4. Формиране и поправяне на ЦПД в рибозомалните гени на ечемика

Рибозомалните РНК гени са подходящ обект за изучаване на репарацията на ниво гени при растенията поради тяхната висока повтореност (в генома на ечемика те са представени с над 2000 копия в хаплоиден геном; *Ananiev, 1992*), което позволява лесна визуализация и количествен репаративен анализ (*Manova and Stoilov, 2003, Manova et al., 2006; Манова, 2007*).

Първоначално беше сравнена чувствителността на гДНК и рибозомалната ДНК (рДНК) фракции към УВ-С. Количеството ЦПД, получено след облъчване с 2.5 kJ/m² УВ-С, показва 1.1/10 кб. ЦПД в рДНК, докато съответната стойност за гДНК беше 1.7 ЦПД на 10 кб. Същата тенденция беше установена след облъчване с 5 kJ/m² - около 1.6^{±0.4} ЦПД/10 кб. бяха измерени в рибозомалните повтори, което е значително по-малко от това, изчислено при тоталната гДНК, където съответната стойност беше 2.35 ЦПД/10 кб.

Кинетиката на репарация на ЦПД в ечемичните рибозомални

гени беше изследвана при 6-дневни млади растения от линия Freya отглеждани на тъмно или на светло, след облъчване с 5 kJ/m^2 УВ-С, с последващо излагане на СС с висок интензитет. Оказа се, че в младите ечемични прорастъци ФР е основният механизъм за премахване на ЦПД от ечемичните рибозомални гени като данните показаха 80%, 31% и 23% непоправени ЦПД в рибозомалните повтори след 1, 3 и 6 часа интензивно осветяване със СС на зелени прорастъци от линията Freya (Фиг.6.).



Фиг.6. Представителен хибридизационен профил и сравнителна репаративна кинетика на ЦПД в рибозомалните гени и гДНК.

В условията на осветяване с ФС с нисък интензитет, кинетиката на ЦПД репарация е подбна на тази при гДНК.

Експериментите за оценка на светлинно-независимата репарация в ечемичните рибозомални гени не показват значимо намаляване на ЦПД дори след 24 часа инкубация на тъмно.

Изследванията, занимаващи се с оперирането на различни репаративни механизми в растителните рибозомални гени са ограничени (Chen et al. 1996, Manova and Stoilov, 2003, Manova et al. 2006). До момента репаративните механизми, ангажирани в премахването на ЦПД от растителните рибозомални гени са изследвани предимно при

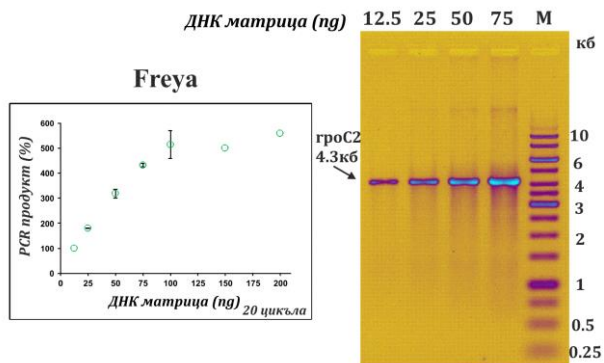
Arabidopsis. Установено е, че те ефективно се фотореактивират и в повтарящите се рДНК повтори и в селектирани на случаен принцип уникални ядрени повтори (Chen et al., 1996). Ние също показваме, че количествата на индуцираните ЦПД в ечемичните рибозомални гени могат ефективно да бъдат редуцирани в условия на осветяване. Това са първите данни за оперирането на ФР в рДНК при културни растения. В допълнение, не беше измерено намаляване на ЦПД в ечемични листа до 24 часа тъмнинна инкубация, в съгласие с данните получени за рДНК при *Arabidopsis*, което е индикация, че изрязващи или рекомбинативни пътища не са въввлечени в премахването на ЦПД от рибозомалните гени на растенията (Chen et al., 1996). Има данни, че ХР е замесена в поправянето на ЦПД при *Arabidopsis*, като тя, обаче, е зависима от излагането на видима светлина (Ries et al. 2000). Само малка част от растителната рДНК се транскрибира активно (20% в домат), а при ечемика тази фракция може би е дори по-малко (Conconi et al., 1992). По тази причина, на основата на представените резултати не може да се определи дали наблюдаваната репаративна кинетика отразява средното ниво на поправяне в рДНК или предимно по-ефективното премахване на ЦПД от транскрибиращата се рДНК фракция, която вероятно се намира в по-релаксирана хроматинова конформация.

3. PCR-базирани подходи за изследване на кинетиката на репарация в извънядрените геноми на ечемика

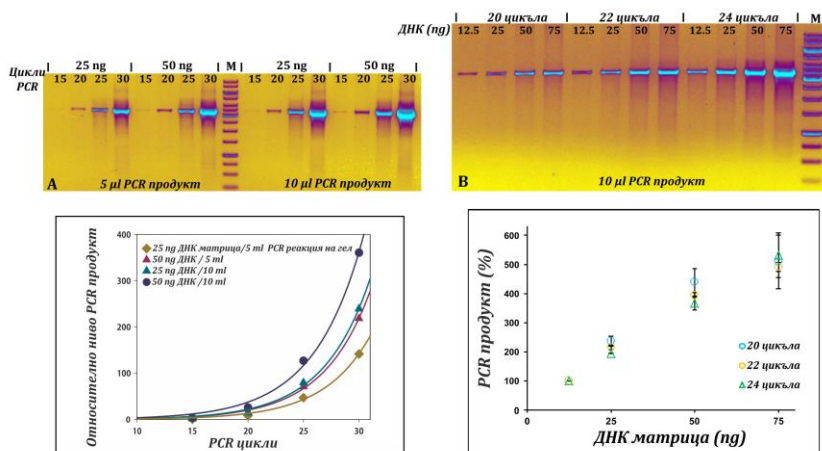
3.1. PCR амплификация на дълги ДНК фрагменти

Long-Range PCR беше адаптиран и въведен в нашата лаборатория, за да се изследват репаративните механизми, отстраняващи ДНК повредите, индуцирани от УВР в хл и мт геноми на ечемика в сравнение с тези, опериращи в ядрения му геном.

В тази връзка беше направена оптимизация на PCR условията за количествена амплификация на ДНК фрагменти от хл *groC2* и *psaB/psaA* гени, както и фрагмент от мт *grs2* ген.



Фиг.7. Повишаването на количеството PCR продукт от *гросС2* гена в зависимост от началното количество на ДНК матрицата.



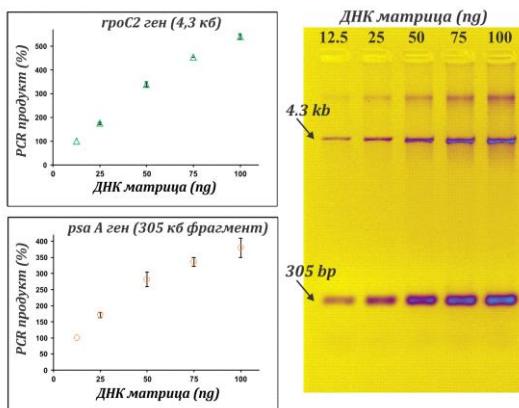
Фиг.8. Визуализация на увеличаването на количеството на мт *rps2* фрагмент в зависимост от броя цикли за размножаване (А), изходната ДНК матрица (В), и количеството PCR продукт нанесено на гела (А).

Коректното измерване на честотата на ДНК повредите в определен фрагмент предполага линейна зависимост между началното количество ДНК матрица и количеството на получения PCR продукт. Такава линейна зависимост между първоначалното количество на ДНК и количеството на получения PCR продукт беше наблюдавана за всички фрагменти, като тази зависимост намаляваше и се наблюдаваше постепенно насищане в количеството на получения продукт (Фиг.7.;

Фиг. 8.).

3.2. Мултиплексен PCR

Multiplex PCR беше използван и с цел да се покаже, че възстановяването на нивата на амплификация в хл и мт гени се дължи на възстановяване на целостта на ДНК, а не на промяна в броя копия на използваната ДНК матрица.



Фиг.9. Зависимост между началното количество ДНК и количеството получен PCR продукт след Multiplex PCR.

Данните от количественото оптимизиране на Multiplex PCR реакциите за едновременно намножаване на дълъг фрагмент от хл ген *groC2* и къс фрагмент от хл ген *psaA* са представени на Фиг.9.

4. Репарация на ДНК фотопродукти в извънядрените ечемични геноми

Според наличните литературни данни е трудно да се заключи със сигурност дали съществува репарация в хл и мт геноми при висшите растения. Освен това, в литературата няма изследвания, които да анализират репаративните механизми, опериращи в ечемичните извънядрени геноми. В тази връзка, решихме да изследваме дали в ечемичните хл и мт геноми оперират репаративни механизми и каква е тяхната природа.

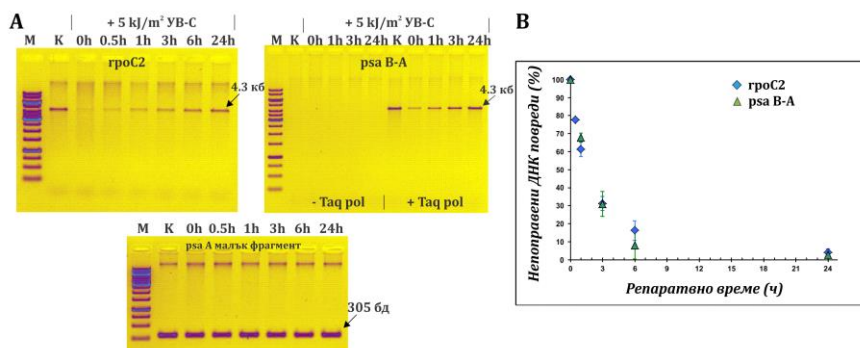
Ефективността на отстраняване на ДНК повредите в тези геноми

беше изследвана чрез PCR базирани методи. Типът на ангажираните репаративни механизми (ФР или ТР) беше изследван чрез инкубация на облъчените растения при различни условия – интензивно осветяване или липса на светлина.

4.1. Хлоропластен геном

При висшите растения броят на хл геноми може да варира значително в зависимост от светлинните условия и степента на развитие на растението (*Kumar et al., 2014*), което може да повлияе на репаративния анализ.

Резултатите показаха, че амплификацията на малкия фрагмент не се променя съществено, за разлика от тази на големите фрагменти (Фиг.10.). Следователно, по време на репаративната инкубация на прорастъците няма значително вариране в броя копия на хл геноми, което да е достатъчно да компенсира възстановяването на PCR амплификацията, наблюдавана при дългите фрагменти като репаративна активност.



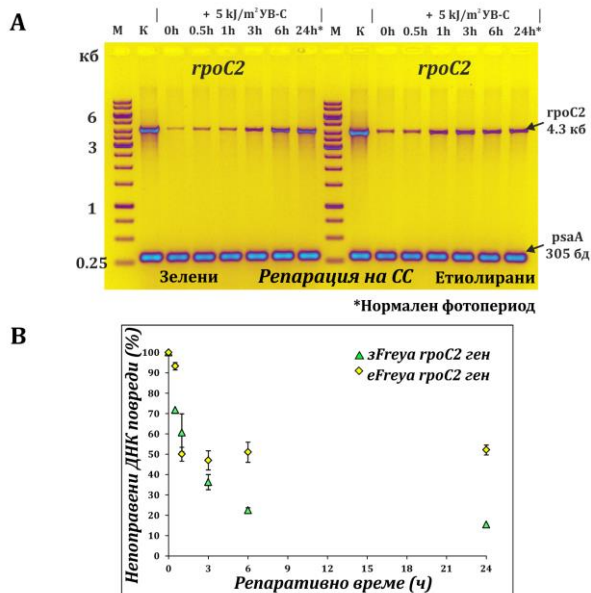
Фиг.10. (А) Различия в ефикасността на PCR амплификацията на хл *gpoC2* и *psaB-A* гени в зависимост от периода на осветяване. Амплификация на малкия фрагмент *psaA*, чиято ефективност не е засегната от облъчването; (В) Репаративната кинетика, показваща намаляването на ДНК фотопродуктите в хл гени *gpoC2* и *psaB-A*.

Получените данни за репарацията в хл геном на ечемика след Long-Range PCR показаха, че ДНК фотопродуктите се отстраняват много

ефективно чрез светлинно-зависим механизъм, както от *groC2* гена, така и от фрагмента представителен за хлоропластните *psa B/A* гени. В допълнение, нивото на непоправените фотопродукти във фрагмента на *groC2* гена след 1 час репарация на интензивна слънчева светлина беше $61.27^{+3.95}\%$, след 3 часа – $31.19^{+3.79}\%$, след 6 часа – $16.21^{+5.37}\%$, а след 24 часа – $3.99^{+1.94}\%$. Количеството на непоправени фотопродукти във фрагмента на *psaB-A* гените в условията на светлинна репарация след 1, 3, 6 и 24 часа беше съответно $67.84^{+2.54}\%$, $30.85^{+6.9}\%$, $8.04^{+7.53}\%$ и 2.58% (Фиг.10.).

Данните от Multiplex PCR за гена *groC2* при зелените ечемични прорастъци показаха, че след първите 30 мин. облъчване можеше да бъде наблюдавано възстановяване на PCR амплификацията, което говори за наличието на известни нива на поправяне на ДНК. Тенденцията за намаляване на количеството на УВ повредите в хл геном на отглежданите на светло ечемични прорастъци продължаваше да намалява 24 часа по-късно, когато около 85% от първоначално индуцираните увреждания вече бяха поправени. В отглежданите на тъмно прорастъци обаче, беше установена различна кинетика на премахване на фотопродуктите от *groC2* гена, където 30 мин. след излагането им на слънчева светлина след облъчването, репарация беше едва доловима, но след 1 час около 50% от уврежданията бяха вече премахнати. Въпреки това, за разлика от зелените растения, при етиолираните при по-продължителна репаративна инкубация допълнително елиминиране на фотоповреди не беше отчетено (Фиг.11.).

Впоследствие беше изследвано участието и на тъмнинните репаративни механизми. За разлика от резултатите, получени за тоталната гДНК, където беше отчетена активност на тъмнинните репаративни механизми след 120 часа инкубация на тъмно на ечемичните прорастъците облъчени с УВР, в хл геном не беше установена подобна активност при отстраняване на ДНК повредите.



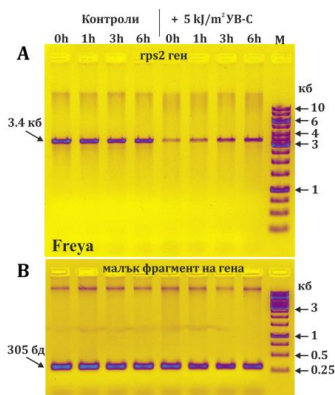
Фиг.11. (А) Репарацията на UV-индуцирани повреди, детектирана посредством Multiplex PCR, в хл ген *groC2*. (В) Хистограмно представяне на репаративната кинетика, показваща намаляването на ДНК фотопродуктите.

4.2. Митохондриален геном

Данните показаха намаляване на амплификацията на дългия фрагмент от мт *grs2* ген при ДНК проби, изолирани от облъчените прорастъци веднага след третирането в сравнение с контролата. Тенденция към възстановяване на ефективността на амплификация беше наблюдавана след 1 час репаративна инкубация и до 6 часа по-късно. От друга страна, амплификацията на дългия фрагмент от *grs2* гена в контролните растения не показва никакви промени. Амплификацията на късия фрагмент също не показва съществени отклонения, следователно възстановяването на PCR амплификацията, наблюдавана при дългите фрагменти от облъчените растения е резултат от премахване на ДНК повредите, блокиращи полимеразата в мт *grs2* ген (Фиг.12.).

При сравняване на данните, получени за репаративната кинетика в мт *grs2* ген и хл *groC2* ген беше очевидно, че скоростта на елиминиране

на повредите от мт геном е забавена. Докато в хл геном след само 30 мин. репаративна инкубация около 22% от уврежданията бяха поправени, а след 1 час тази стойност превиши 38% (Фиг.10), то в мт геном не се наблюдаваше намаляване на фотоповредите след 30 мин. и по-малко от 37% бяха поправени след 3 часа излагане на светлина (Фиг.13). В допълнение, степента на светлинно-зависима репарация в етиолираните прорастъци беше по-неефективна, тъй като след 24 часа по-малко от 12% от повредите бяха отстранени (Фиг.13).

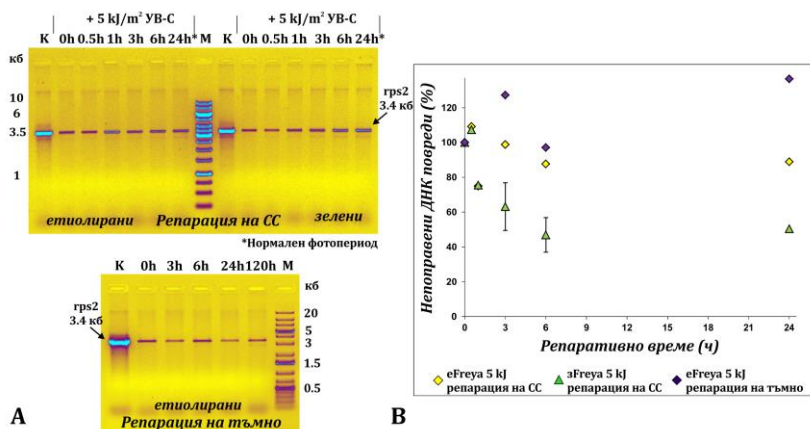


Фиг.12. (А) Зависимостта на PCR амплификацията на дългия *gprs2* фрагмент (3.4 кб.) от присъствието на PCR блокиращи повреди в облъчените проби. (Б) Незасегнатата амплификация на късия *gprs2* фрагмент (305 бд.).

При изследванията, проведени за установяване дали тъмнинните репаративни механизми допринасят за отстраняване на ДНК фотопродуктите от мт геном, данните не показаха редукция на повредите дори след 120 часа репаративна инкубация на тъмно (Фиг.13.).

Ечемикът притежава ДНК репаративни механизми, поправящи УВ-индуцираните повреди в хл и мтДНК, като тези механизми са светлино-зависими и участват в поддържането на интегритета на органелните геноми. Освен това, според нашите данни, репаративната кинетика наблюдавана при хл гени е подобна, но все пак различна от тази наблюдавана на ниво гДНК. Въпреки сходните резултати по отношение на репаративната кинетика, пряко сравнение между

геномната ЦПД репарация и ген-специфичната не може да се направи, поради факта, че PCR амплификацията е чувствителна към всички УВ повреди. Също така, данните показаха, че светлинно-зависимите репаративни пътища за елиминиране на фотоповреди в хл гени вероятно оперират относително по-ефективно в сравнение с тези, които са активни в мт.



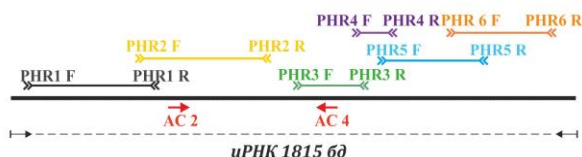
Фиг.13. (А) Отстраняване на УВ-С индуцирани фотоповреди от ечемичния мх *gprs2* ген. (В) Хистограмно представяне на репаративната кинетика.

От друга страна, за разлика от данните на ниво гДНК след 5-дневна инкубация при липса на светлина, на практика не бяха установени промени в количеството на формираните фотопродукти в хл и мт гени при инкубация на растенията на тъмно, което показва, че тъмнинни репаративни механизми не участват в поправянето на фотоповредите в органелните геноми при ечемика.

5. Клониране и секвениране на ЦПД-фотолиазния ген в генома на ечемика

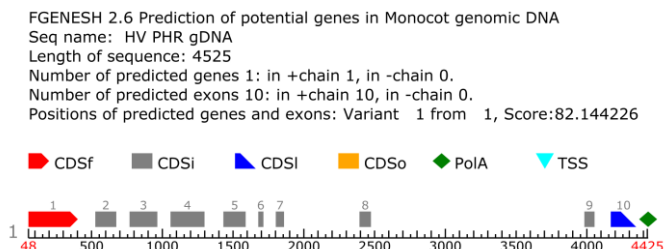
С цел идентификацията на ечемичния ЦПД фотолиазен ген първоначално беше амплифицирана частична последователност от него посредством дегенерирани праймери (AC2, AC4R; Hirouchi *et al.*, 2003), проектирани да намножават силно консервативна последователност от

ЦПД-фотолиазния ген при *Arabidopsis* и *Chlamydomonas*. В резултат получихме ДНК последователност с дължина 1086 бд. от предполагаемия ечемичен ЦПД-фотолиазен ген. С така получената последователност беше проведено търсене в базата данни на NCBI за фотолиаза-хомоложни последователности. В резултат на това идентифицирахме иРНК (AK372010.1; *Matsumoto et al.*, 2011), показваща пълна хомология със съответните кодиращи участъци на нашия фотолиазен фрагмент и 85% хомология с добре характеризираната иРНК при ориза. На базата на тази иРНК бяха конструирани шест двойки праймери, амплифициращи припокриващи се фрагменти, които да обхванат цялата геномна последователност на ЦПД-фотолиазния ген при ечемика (Фиг.14.).



Фиг.14. Праймерни двойки, използвани за идентифициране на геномната последователност на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген.

Впоследствие бяха амплифицирани пет фрагмента, от които беше конструиран фрагмент с дължина 4525 бд., представляващ геномната последователност на ЦПД-фотолиазния ген при ечемика.



Фиг.15. Анализ на ечемичния ген за ЦПД фотолиаза с онлайн базираната програма Softberry FGENESH 2.6.

При анализ на гена с онлайн базираната програма Softberry FGENESH 2.6, се установи, че ечемичният ЦПД фотолиазен ген съдържа

10 екзона и 9 интрона (Фиг.15.). Дължината на предполагаемата ечемична иРНК се оказа 1524 бд., а теоретично очаквания протеин - 507 ак. Секвенцията на идентифицирания от нас ЦПД-фотолиазен ген беше включена в генната банка на NCBI под идентификационен номер "HV_CPD_photolyase KC345035", а идентификационният номер на теоретично очаквания протеин е "AGH70333.1"

Освен това се оказа, че нашата последователност е най-близка по сходство с ЦПД-фотолиазните гени при брахиподиум и ориз. Направеният допълнителен анализ на секвенцията показва, че тя се локализира в късото рамо на хромозома 7Н. Характерна особеност на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген са нетипично дългият интрон 8 и транспозон от типа Stowaway Thalos-2 от фамилията MITE в интрон 7, които липсват при най-близкородствените фотолиази на брахиподиум и ориз. В допълнение, използваната в нашите изследвания линия Freya съдържа глутамин (Gln) на позиция 297, което при различните сортове ориз се свързва с УВ-толерантност.

6. TILLING и EcoTILLING на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген

TILLING и EcoTILLING експериментите бяха проведени в лабораториите на катедрата по Генетика на Силезийския университет, Катовице, Полша.

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) е не-трансгенен реверсивно-генетичен метод в молекулярната биология, който позволява директна идентификация на точкови мутации в специфичен ген. Протоколите разработени за TILLING са адаптирани и за откриването на естествено нуклеотидно разнообразие, процес наречен EcoTILLING (*Till et al., 2006*).

3840 индивида от M2 поколението на мутагенизираната полска NorTILLUS популация, бяха претърсени за индуцирани мутации в ечемичния ЦПД-фотолиазен ген чрез TILLING стратегията. Първоначалните анализи показаха потенциални позитивни сигнали във

фрагмент PHR_2. Въпреки това, след секвениране на съответните ДНК проби не бяха открити промени в нуклеотидните им последователности.

Индивиди от българските кариотипове ечемик, бяха претърсени за индуцирани и/или естествени полиморфизми в ЦПД-фотолиазния ген чрез EcoTILLING стратегията, но такива не бяха открити.

Тъй като регионът, в който е локализиран фрагментът PHR_2, е с по-ниска вероятност за формиране на мутации, се налага по-нататъшна оптимизация на условията за TILLING на региона, в който са локализирани фрагментите PHR_1a и PHR_1b, въз основа на която ще може да се постигне по-ефективно претърсване на тези региони за наличието на индуцирани или естествени мутации.

7. Транскрипционен профил на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген

От интерес беше и да се проследи дали вариациите в нивата на експресия на ЦПД-фотолиазния ген са свързани с различията, наблюдавани в репаративната кинетика на ЦПД фотоповредите, получени при репаративните анализи по отношение на етиолираните зелени прорастъци.

Получените от нас предварителни резултати от полуколичествения RT-PCR бяха потвърдени от данните получени посредством RT-qPCR.

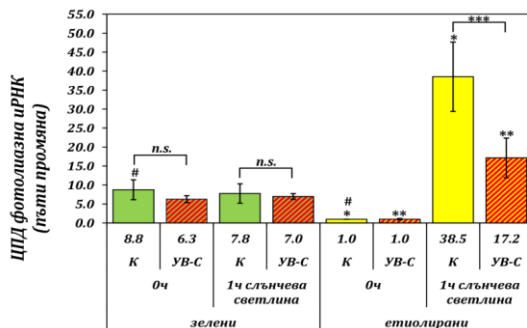
Резултатите от RT-qPCR показаха, че определени количества транскрипти на ЦПД-фотолиазния ген съществуват в етиолирани прорастъци (контролните и облъчените ечемични растения). Въпреки това, тези количества иРНК бяха значително по-малко отколкото тези в зелените растения, при които измерихме $8.8^{\pm 2.6}$ пъти повече транскрипти (Фиг.16.). Това е в съгласие с базовите нива на *AtPHR1*, установени при етиолирани прорастъци от *Arabidopsis* (Castells et al., 2010).

Излагането на отглежданите на тъмно ечемични прорастъци на СС с висок интензитет за 1 час доведе до бързо натрупване на ЦПД-фотолиазни транскрипти, което беше по-добре изразено при

контролните растения ($38.5^{+9.1}$ пъти увеличение). Следователно, СС с висок интензитет е мощен сигнал, който активира бързото акумулиране на транскрипти на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген. Освен това в този времеви интервал нивата на експресия на ЦПД-фотолиазния ген при етиолираните растения, дори и при УВ-С облъчените, значително надвишават тези, установени при зелените прорастъци. УВ-фотопродуктите, и ЦПД по-конкретно, подтискат нормалните транскрипционни нива, като по този начин намаляват количествата на иРНК докато гена бъде репарирен. Следователно, присъствието на ЦПД може да влияе негативно върху натрупването на ЦПД-фотолиазни транскрипти в УВ-С облъчените етиолирани растения в сравнение с контролните.

Като се вземе предвид бавната кинетика на ФР на ЦПД в етиолираните ечемични листа, измерена на ниво цялостен геном, и ефективната транскрипция на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген, която се наблюдава в рамките на първия час след облъчването, може да се предположи наличието на по-бърза репарация на ЦПД-фотолиазния ген в сравнение с останалите региони на ечемичния геном.

Проведените експерименти не показаха значим ефект на УВ-С радиацията върху експресията на ЦПД-фотолиазния ген в зелените прорастъци до 1 час след облъчването. УВ-С дозата от 5 kJ/m^2 нямаше видим ефект и върху малкото количество транскрипти, измерени при етиолираните прорастъци веднага след облъчването. От друга страна, УВ-С влияе значително върху индукцията на гена и акумулирането на новосинтезирани ЦПД-фотолиазни транскрипти, като след 1 час излагане на слънчева светлина УВ-С облъчените етиолирани ечемични растения съдържаха по-малко от половината иРНК в сравнение с контролните прорастъци. Въпреки това, количествата на генните транскрипти оставаха по-високи ($17.2^{+5.2}$ пъти повече), отколкото тези съдържащи се в зелените (контролни и облъчени растения) (Фиг.16.).



Фиг.16. Транскрипционен профил на ЦПД фотолиазния ген при ечемични прорастъци. * показва статистически значима разлика при $P < 0.05$ (t-test) между контролите на етиолираните прорастъци в различни времеви точки; ** показва статистически значима разлика при $P < 0.05$ (t-test) между УВ-С облъчените проби от етиолираните растения в различни времеви точки; *** показва статистически значима разлика при $P < 0.05$ (t-test) между контролни и третирани проби от отглеждани на тъмно ечемични растения след 1 час излагане на слънчева светлина; # показва статистически значима разлика при $P < 0.05$ (t-test) между контроли от отглеждани на тъмно и светло ечемични прорастъци; n.s. – няма статистически значима разлика.

Подобен резултат може да се обясни с по-ефективната ЦПД фоторепарация открита в зелените ечемични листа като цяло, както и с по-ниската степен на транскрипция, която най-вероятно е необходима за поддържане на постоянни нива на ЦПД-фотолиазата. Също така е очевидно, че в рамките на анализирания времеви период, УВ-С светлината не съдейства за повишаване на експресията на ЦПД-фотолиазния ген в зелените ечемични листа.

Получените от нас резултати за експресията на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген са първи опит да се характеризира неговия транскрипционен профил. В тази връзка би представлявало интерес да се продължат изследванията върху влиянието на УВР и факторите от околната среда върху експресията на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До момента връзката между УВ-толерантността при растенията и тяхната способност да се справят с УВ-индуцираните ДНК повреди все още е в процес на изследване. По тази причина, разбирането в дълбочина на ДНК репаративните механизми като основен компонент на УВ защитната стратегия на културните растения, е от съществено значение за определянето на техния потенциал да отговарят и да се адаптират към разнообразните стресови фактори на околната среда.

В настоящия дисертационен труд са изследвани ефективността и относителният принос на светлинно-зависимите и опериращите на тъмно ДНК репаративни пътища за премахването на ЦПД в ечемични прорастъци, като тяхната активност е проследена на ниво тотална гДНК, рДНК и извънядрени геноми. Като цяло, резултатите показваха очевидно доминиране на фоторепарацията над тъмнинните ДНК репаративни механизми в ечемичните листа след облъчване с широк спектър от УВ-С дози. Ефикасността на отстраняването на ЦПД чрез светлинно-зависимите репаративни пътища корелира с интензитета и качеството на светлината, използвана при възстановителната инкубация.

В настоящата работа също така е демонстрирано, че етиолираните ечемични прорастъци притежават по-ниска ЦПД репаративна способност в сравнение със зелените, която корелира с по-ниските експресионни нива на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген при растенията отглеждани на тъмно. Излагането на младите етиолирани растения на слънчева светлина води до драстично увеличаване на транскрипционните нива на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген, докато УВ-С радиацията намалява до известна степен количеството на новосинтезираните транскрипти.

Представените резултати допринасят за изясняване на ролята на ДНК репаративните механизми и техния генетичен контрол във връзка с

УВ толерантността при ечемика. Тъй като гените за УВ-защита са сред основните фактори, определящи нормалния растеж при растенията, то задълбочените изследвания на транскрипционния контрол на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген в зависимост от условията на околната среда биха допринесли за подобряването на адаптивните характеристики на тази селскостопанска култура.

VII. ИЗВОДИ

Въз основа на получените в настоящия дисертационен труд резултати, са формулирани следните основни изводи:

1. В листни прорастъци от ечемик, подложени на УВ стрес, оперират преимуществено светлинно-зависими механизми за отстраняване на ДНК повредите, най-вероятно фотореактивация, като защитна реакция за поддържане целостта на генома.

2. Интензивността и спектърът на светлината влияят върху репарацията на ЦПД в ечемичния геном - фотореактивацията е по-ефективна на слънчева светлина с висок интензитет, докато на флуоресцентна светлина с нисък интензитет е значително забавена.

3. Тъмнинни репаративни и/или толериращи ДНК повредите механизми допринасят за намаляване на УВ-С индуцираните ЦПД в ечемичната ДНК на ниво цялостен геном, но те се активират със значително забавяне в сравнение със светлинно-зависимата фотореактивация.

4. Индуцираните от УВ-С лъчи ЦПД се отстраняват ефективно в рибозомалните гени на ечемика чрез светлинно-зависим репаративен механизъм, чиято кинетика е сходна с установената в генома като цяло.

5. Дейността на светлинно-зависимите механизми за премахване на УВ-индуцираните ДНК повреди не се ограничава само до ядрената ДНК, но е ефективна и в хлоропластния и митохондриалния геноми на ечемика.

6. Тъмнинни изрязващи репаративни механизми не участват в поправянето на ДНК фотопродуктите в хлоропластния и митохондриалния геноми в ечемични прорастъци, изложени на УВ-С радиация.

7. Идентифицирана и секвенирана е геномната ДНК последователност с дължина 4525 бд., представляваща ЦПД-фотолиазния ген при ечемика. Секвенцията е най-близка по сходство с последователностите на ЦПД-фотолиазните гени при брахиподиум и ориз.

8. Експресионният профил на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген в норма и след УВ-С облъчване показва, че видимата светлина е мощен сигнал, влияещ върху експресията на ЦПД-фотолиазата, докато УВ-С радиацията не оказва стимулиращо въздействие.

9. Проведените *TILLING* и *EcoTILLING* експерименти не показаха наличието на точкови мутации и/или полиморфизми в ЦПД-фотолиазния ген при изследваните популации ечемик (полската мутагенизирана популация и българските гама-реконструирани кариотипове ечемик).

VIII. ПРИНОСИ

1. Направена е детайлна характеристика на типа и ефективността на ДНК репаративните механизми, отговарящи за отстраняването на УВ-С индуцираните ЦПД в листни прорастъци от ечемик. Установено е, че светлинно-зависимата репарация функционира с висока ефективност както в ядрения геном, така и в извънядрените хлоропластни и митохондриални гени.

2. Успешно е секвениран геномен ДНК фрагмент с дължина 4525 бд., обхващащ целия ечемичен ген, кодиращ ЦПД фотолиазата, и е определена екзон-интронната му структура, като секевенцията е предоставена и достъпна в публичната база данни на NCBI под номер за достъп KC345035.

3. За първи път е характеризиран експресионният профил на ЦПД фотолиазния ген при ечемика и е установено, че слънчевата светлината с висок интензитет е мощен сигнал, водещ до повишаване на транскрипционните му нива в етиолираните растения, докато УВ-С радиацията, в рамките на изследваните времеви периоди, оказва рестриктивен ефект.

IX. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Ananiev E (1992)** Nuclear genome structure and organization. In: Shewry PR (ed.) *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*, CAB International, Wallingford, pp 133-150
2. **Britt AB (1995)** Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology* **108**:891-896
3. **Britt AB (1999)** Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science* **4**:20-25
4. **Casati P, Campi M, Morrow DJ, Fernandes J and Walbot V (2011)** Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of maize responses to UV-B. *Plant Signaling and Behavior* **6**:1146-1153
5. **Castells E, Molinier J, Drevensek S, Genschik P, Barneche F and Bowler C (2010)** det1-1-induced UV-C hyposensitivity through UVR3 and PHR1 photolyase gene over-expression. *The Plant Journal* **63**:392-404
6. **Chen JJ, Jiang CZ and Britt AB (1996)** Little or No Repair of Cyclobutyl Pyrimidine Dimers Is Observed in the Organellar Genomes of the Young Arabidopsis Seedling. *Plant Physiology* **111**:19-25
7. **Conconi A, Sogo JM and Ryan CA (1992)** Ribosomal gene clusters are uniquely proportioned between open and closed chromatin structures in both tomato leaf cells and exponentially growing suspension cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:5256-5260
8. **Dany AL, Douki T, Triantaphylides C and Cadet J (2001)** Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within Arabidopsis thaliana DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **65**:127-135
9. **Doyle JJ and Doyle JL (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**:11-15
10. **Gecheff K (1978)** Cytogenetic study on a barley translocation line and some conclusions concerning chromosome karyogram designation. *Genet Pl Breed* **11**:17-22
11. **Gegas VC, Wargent JJ, Pesquet E, Granqvist E, Paul ND and Doonan JH (2014)** Endopolyploidy as a potential alternative adaptive strategy for Arabidopsis leaf size variation in response to UV-B. *Journal of Experimental Botany* **65**:2757-2766
12. **Hidema J, Song I-K, Sato T and Kumagai T (2001)** Relationship between Ultraviolet-B Sensitivity and Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photorepair in Rice. *Journal of Radiation Research* **42**:295-303
13. **Hirouchi T, Nakajima S, Najrana T, Tanaka M, Matsunaga T, Hidema J, Teranishi M, Fujino T, Kumagai T and Yamamoto K (2003)** A gene for a Class II DNA photolyase from Oryza sativa: cloning of the cDNA by dilution-amplification. *Molecular Genetics and Genomics* **269**:508-516
14. **Holá M, Vágnerová R and Angelis KJ (2015)** Mutagenesis during plant responses to UVB radiation. *Plant Physiology and Biochemistry* **93**:29-33
15. **Klem K, Ač A, Holub P, Kováč D, Špunda V, Robson TM and Urban O (2012)** Interactive effects of PAR and UV radiation on the physiology, morphology and leaf optical properties of two barley varieties. *Environmental and Experimental Botany* **75**:52-64
16. **Kumar RA, Oldenburg DJ and Bendich AJ (2014)** Changes in DNA damage, molecular integrity, and copy number for plastid DNA and mitochondrial DNA during

maize development. *Journal of Experimental Botany* **65**(22):6425-6439

17. Manova VI and Stoilov LM (2003) Induction and recovery of double-strand breaks in barley ribosomal DNA. *DNA Repair* **2**:983-990

27. Manova V, Gecheff K and Stoilov L (2006) Efficient repair of bleomycin-induced double-strand breaks in barley ribosomal genes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **601**:179-190

18. Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T and Sato K (2011) Comprehensive Sequence Analysis of 24,783 Barley Full-Length cDNAs Derived from 12 Clone Libraries. *Plant Physiology* **156**:20-28

19. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:e45-e45

20. Ries G, Buchholz G, Frohnmeyer H and Hohn B (2000) UV-damage-mediated induction of homologous recombination in Arabidopsis is dependent on photosynthetically active radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13425-13429

21. Sutherland BM, Bennett PV and Sutherland JC (1999) DNA Damage Quantitation by Alkaline Gel Electrophoresis. In: DS Henderson (ed) *DNA Repair Protocols*, Humana Press pp 183-202

22. Sutherland BM, Bennett PV and Sutherland JC (2006) DNA Damage Quantitation by Alkaline Gel Electrophoresis. In: DS Henderson (ed) *DNA Repair Protocols*, Humana Press. pp 251-273

23. Takeuchi Y, Murakami M, Nakajima N, Kondo N and Nikaido O (1998) The Photorepair and Photoisomerization of DNA Lesions in Etiolated Cucumber Cotyledons after Irradiation by UV-B Depends on Wavelength. *Plant and Cell Physiology* **39**:745-750

24. Takeuchi Y, Iida Y, Nakajima N and Nikaido O (2000) Formation of DNA Lesions in Cucumber Cotyledons Exposed to Solar UV Radiation. *ENVIRONMENTAL SCIENCE* **13**:351-355

25. Till BJ, Zerr T, Comai L and Henikoff S (2006) A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols* **1**(5):2465-2477

26. Манова Василиса (2007) Репарация на двойно-верижни ДНК скъсвания в рибозомалните гени на ечемика (*Hordeum vulgare* L.). Дисертация.София, 2007. 154 л

Х. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Научни публикации в пълен текст

1.1. Manova V., **Georgieva R.**, Georgieva M., Nikolova I., Gecheff K., Stoilov L. (2015) DNA and chromosomal damage as a hallmark of the induced genomic instability in barley. *Genetics and Plant Physiology*, **5**(3-4):231-246;

1.2. Manova V.¹, **Georgieva R.**¹, Borisov B., Stoilov L. (2016) Efficient removal of cyclobutane pyrimidine dimers in barley: differential contribution of light-dependent and dark DNA repair pathways. *Physiologia Plantarum*, **158**:236-253. DOI:10.1111/ppl.12446; **IF 3.52/2015**.

2. Принос към бази данни

Секвенцията на идентифицирания ЦПД фотолиазен ген в генома на ечемика е включена в генната банка (GenBank) на NCBI под идентификационен номер "HV_CPD_photolyase KC345035" и с идентификационен номер на теоретично очаквания протеин "AGH70333.1";

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/469664982>

1. *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cultivar Freya putative CPD photolyase gene, complete cds; GenBank: KC345035.1; Manova, V.I., **Georgieva, R.G.**, Borisov, B.P. and Stoilov, L.M.; Direct Submission, Submitted (15-DEC-2012); Department of Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, G. Bonchev Str., Bldg. 21, Sofia 1113, Bulgaria;

3. Постери и доклади, представени на научни форуми

3.1. **Georgieva R.**, V. Manova, L. Stoilov "Repair response of barley genome to UV-C induced stress", Conference: Molecular Basis of Plant Stress, Sunny Day Black Sea Resort, Bulgaria, 21-23 September 2011, p57;

3.2. **Georgieva Ralitsa** "DNA Damage and repair in plants", SymBioSE2013, Sheffield, United Kingdom, 28.07-01.08.2013, p.19;

3.3. **Georgieva R.**, Manova V., Stoilov L. „Effect of light-growth conditions and UV-C irradiation on the transcriptional profile of CPD

¹ Тези автори са допринесли поравно за тази статия

photolyase gene in barley“, Conference: Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges, Sofia, Bulgaria. 24-26 September 2014, p.52;

3.4. Manova V., **Georgieva R.**, Stoilov L., „*Molecular mechanisms of UV-induced DNA damage response in barley*“, Conference: Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges, Sofia, Bulgaria. 24-26 September 2014, p.19;

3.5. Stoilov L., Manova V., Georgieva M., **Georgieva R.**, Nikolova I., Gecheff K., Luxiang L., Cremonini R. „*Aspects of the induced genetic instability in barley genome*“, Conference: Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges, Sofia, Bulgaria. 24-26 September 2014, p.17.

3.6. Lubomir Stoilov, Kostadin Gecheff, Vasilissa Manova, Mariana Georgieva, **Ralitzha Georgieva**, Ivelina Nikolova. „*Cytogenetic and molecular aspects of the experimental mutagenesis in barley.*“, Conference: 90 YEARS INSTITUTE OF AGRICULTURE - KARNOBAT „Sustainable development of agriculture a priority of modern agricultural science“, Karnobat, Bulgaria, 3-4 June 2015.

4. Проекти

1.1. **Проект BUL 15481** „*Isolation and Characterization of Genes for Radiation Induced DNA Damage Repair in Barley*“, част от Координационна изследователска програма на МААЕ-Виена „*Isolation and Characterization of Genes Involved in Mutagenesis of Crop Plants*“;

1.2. **Проект BG051PO001-3.3.06-0025** „Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми“.

5. Специализации

3.1. Тримесечна специализация в Силезийския университет, Катовице, Полша в периода от 01/03/2013 до 31/05/2013, по Програмата Еразъм за мобилност на докторанти, грант SM-11/2012-2013;

3.2. Едномесечна специализация в Университета Филипс, Марбург, Германия в периода от 25/06/2014 до 25/07/2014, по проект BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес“;

3.3. Едномесечна специализация в Университета Филипс, Марбург, Германия в периода от 09/10/2014 до 07/11/2014, по проект BG051PO001-3.3.06-0025