

Резюмета на публикации

на гл. ас. д-р Миглена Николова Ревалска

от Агробиоинститут, Селскостопанска Академия

за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност “Доцент” по научна специалност "Генетика", професионално направление 4.3 Биологически науки, Област 4. Природни науки, математика и информатика, обявен в ДВ бр. 23 от 13.02.2024г.

Показател В4. Хабилитационен труд или равностойни научни публикации (не по-малко от 10), публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация

1. [B.4.1] A. Iantcheva, V. Vassileva, M. Ugrinova, M. Vlahova “Development of functional genomic platform for model legume *Medicago truncatula* in Bulgaria”, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 23(4), 1440-1443, 2009; ISSN 1310-2818; DOI 10.2478/V10133-009-0010-X; Q4; SJR = 0.135; IF = 0.291

Abstract

Legumes, because of the high protein content of their seeds in grain legumes, and leaves in forage legumes, are major crop plants used in human food and animal feed. They have the unique capacity among plants to associate with soil bacteria of the genus *Rhizobium* to form nitrogen-fixing nodules, thereby limiting the need for exogenous nitrate. The use of the model legume *Medicago truncatula* over the last 10 years has dramatically improved our understanding of genomic structure and gene function for legumes in general. Nevertheless, the development of new molecular and genetic tools is essential in order to optimize the exploitation of this model plant. For example, insertional mutagenesis is necessary to construct the large-scale mutant collections which will help to identify both key symbiotic and developmental genes, as well as genes of agronomical importance. Although large-scale insertional mutagenesis using T-DNA is not feasible in legumes, the *Tnt1* tobacco retrotransposon can be used as a very efficient mutagen in the *M. truncatula* 2HA Jemalong. This mini review comments utility and challenges of exploring forward and reverse genetic tools for functional genomic studies in *M. truncatula* and particular attention is paid on the use of tobacco *Tnt1* retrotransposon as a tool for insertional mutagenesis in this model legume species. Current and future research activities of the AgroBioInstitute that concern this model species and the exploitation of *Tnt1* insertional mutant collection will carry on in frame of the NSF funded DO02-105 “Centre for sustainable development of plant and animal genomics” project.

Абстракт

Бобовите са основна култура растения, използвани в храната на хората и животните. Това се дължи на високото съдържание на протеини в семената при зърнено бобовите растения и в листата при фуражните бобови растения. Те имат уникалната способност да се свързват с почвените бактерии от род *Rhizobium* и да образуват азотфиксиращи грудки, като по този начин ограничават необходимостта от екзогенен азот. Използването на моделното бобово растение *Medicago truncatula* през последните 10 години драстично подобри разбирането за геномната структура и генната функция на бобовите култури като цяло. Въпреки това, разработването на нови молекулярни и генетични инструменти е от съществено значение за оптимизиране експлоатацията на това моделно растение. Например, инсерционната мутагенеза е необходима за конструиране на широкомащабни колекции от мутанти, което ще помогне да се идентифицират както ключови симбиотични гени и гени отговорни за развитието, така и гени от агрономическо значение. Макар, че широкомащабна инсерционна мутагенеза с използване на Т-ДНК не е осъществима при бобови растения, ретротранспозонът от тютюн *Tnt1* може да се използва като много ефективен мутаген при *M. truncatula* 2НА Jemalong. Това мини ревю коментира полезността и предизвикателствата на инструментите на правата и обратна генетика за функционални геномни изследвания при *M. truncatula* като особено внимание се обръща на използването на ретротранспозон от тютюн *Tnt1* като инструмент за инсерционна мутагенеза в този моделен вид бобово растение. Настоящи и бъдещи изследвания от дейностите на Агробиоинститут, които се отнасят до този моделен вид и експлоатацията на инсерционната колекция от мутанти *Tnt1* ще продължава в рамките на финансирания от ФНИ проект DO02-105 „Център за устойчиво развитие на растителната и животинска геномика“.

2. [B.4.2] G. Naydenova, I. Dincheva, I. Badjakov, M. Radkova, **M. Revalska**, A. Iantcheva, “Long-lasting low temperature pretreatment of soybean seeds enhance plant field performance and content of free metabolites“, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 28(6), 1063–1074, 2022; ISSN 1310-0351; <https://www.agrojournal.org/28/06-13.pdf>; Q3; SJR = 0.216; IF = 0.4

Abstract

The current study presents results from three years experimental work focused on evaluation of climate plasticity and content of free amino acids, mono- and disaccharides and fatty acids of three soybean cultivars by using an innovative approach of long-lasting low temperature pretreatment of soybean grains before sowing. The results from field performance of plants grown from pretreated and non-treated seeds were taken based on five morphological indicators. Expression and metabolomic profiles of leaves, green seeds and mature seeds of plants grown from low temperature pretreated and not-treated seeds were assessed by real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and gas chromatography/mass spectrometry

(GC/MS). The all three years collected data from the morphological analyses, expression profiles and content of metabolites confirmed that the plants grown from low temperature pretreated seeds possess better field performance, enhance content of free amino acids, sugars and fatty acids in green and mature seeds. The obtained expression profiles of selected genes correlated with the content of amino acids and sugars. The obtained results in the present study could benefit legume crops researchers, plant breeders, farmers and processors of soybean.

Абстракт

Настоящото проучване представя резултати от тригодишна експериментална работа, фокусирана върху оценката на климатичната пластичност и съдържанието на свободни аминокиселини, моно- и дизахариди, и мастни киселини от три сорта соя чрез използване на иновативен подход на дълготрайна нискотемпературна предварителна обработка на соевите зърна преди сеитба. Резултатите от полевата установка на растенията отгледани от предварително третирани и нетретирани семена са взети въз основа на пет морфологични показателя. Експресията и метаболомните профили на листа, зелени семена и зрели семена от растения, отгледани от предварително третирани и нетретирани семена при ниска температура, бяха оценени чрез количествена полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция в реално време (qRT-PCR) и газова хроматография/мас спектрометрия (GC/MS). През всичките три години събраните данни от морфологични анализи, профили на експресия и съдържание на метаболити потвърдиха, че растенията, отгледани от предварително третирани при ниска температура семена, притежават по-добра полска производителност, подобро съдържание на свободни аминокиселини, захари и мастни киселини в зелени и зрели семена. Получените експресионни профили на избрани гени съответстват със съдържанието на аминокиселини и захари. Получените резултати в настоящото изследване могат да бъдат от полза за изследователите на бобови култури, селекционери, фермери и преработватели на соя.

3. [B.4.3] M. Radkova, M. Revalska, M. Zhiponova, A. Iantcheva, “Evaluation of the role of *Medicago truncatula* Zn finger CCHC type protein after heterologous expression in *Arabidopsis thaliana*“, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 35(1), 1686–1695, 2021; ISSN 1310-2818; DOI 10.1080/13102818.2021.2006786; Q3; SJR = 0.377; IF = 1.762

Abstract

Zinc finger proteins bind nucleic acids or act in transcriptional or translational regulation. The present study aimed to explore the effect of heterologous expression of the *Medicago truncatula* gene (*Mt-Zn-CCHC*), which encodes a Zinc finger CCHC type protein, in *Arabidopsis thaliana*. The *Mt-Zn-CCHC* gene, which affects seed size in *M. truncatula*, was used for construction of transgenic *A. thaliana* transcriptional reporter plants expressing *pMt-Zn-CCHC::GUS::GFP*, as well as lines with modified expression – overexpressed (OE) and knockdown (RNAi). *In silico*

analysis of the promoter *cis*-elements of *pAt-Zn-CCHC* and *pMt-Zn-CCHC* suggested regulation during meristem activity, seed development, as well as cold stress. The expression of *pMt-Zn-CCHC* was localized in shoot apical meristem and in the base of the siliques. In the RNAi lines, successfully repressed endogenous *At-Zn-CCHC* expression resulted in shortened stem and reduction in silique number, silique size, seed number per silique, and decreased expression of the meristem marker *AtSWP*. In the gain-of-function lines, overexpression of *Mt-Zn-CCHC* acted as a positive regulator in silique and seed parameters, as well as increased *AtSWP* expression. Cold treatment of WT plants demonstrated upregulation of the endogenous *At-Zn-CCHC* and the *RD29A* cold marker gene. In the OE line, *RD29A* transcription was induced by cold faster but in the RNAi line, slower. The overall data support the roles of the studied *Zn-CCHC* gene in the development of shoot meristem, seeds and cold response, which highlights this protein as a conserved regulator in plant reproduction and stress signal transduction.

Абстракт

Zinc finger протеините свързват нуклеинови киселини или действат в транскрипционна или транслационна регулация. Настоящото проучване има за цел да изследва ефекта от хетероложната експресия на ген от *Medicago truncatula* (*Mt-Zn-CCHC*), който кодира протеин тип Zinc finger CCHC, в *Arabidopsis thaliana*. *Mt-Zn-CCHC* генът, който влияе върху размера на семената при *M. truncatula*, е използван за конструиране на трансгенни растения за анализ на промоторната активност от *A. thaliana*, експресиращи конструкта *pMt-Zn-CCHC::GUS::GFP*, както и линии с модифицирана експресия – свръхекспресия (OE) и потисната експресия (RNAi). *In silico* анализ на промоторните *cis*-елементи на *pAt-Zn-CCHC* и *pMt-Zn-CCHC* предполагат регулиране по време на меристемната активност, развитието на семена, както и при стрес студ. Експресията на *pMt-Zn-CCHC* беше локализирана в апикалната меристема на надземната част и в основата на силиките. В RNAi линиите, успешно потиснатата ендогенна експресия на *At-Zn-CCHC* доведе до скъсено стъбло, намаляване броя и размера на силиките, намаляване на броя семена на силикс и понижена експресия на меристемния маркер *AtSWP*. В линиите със свръхекспресия на *Mt-Zn-CCHC*, повишената експресия на гена действа като положителен регулатор в параметрите на силиките и семената, както и повишава експресията на *AtSWP*. Третирането със студ на дивия тип растения (WT) демонстрира повишена регулация на ендогенния *At-Zn-CCHC* и маркерния ген за студ *RD29A*. В OE линията транскрипцията на *RD29A* се индуцира от студ по-бързо, докато в RNAi линията е по-бавно. Общите данни подкрепят ролята на изследвания *Zn-CCHC* ген в развитието на връхната меристема, семената и отговора към студ, което очертава този протеин като запазен регулатор във възпроизвеждането на растения и сигналната трансдукция при стрес.

4. [B.4.4] A. Iantcheva, I. Dincheva, R. Nedeva, G. Naydenova, I. Badjakov, M. Radkova, **M. Revalska**, A. Apostolov, “An innovative approach for the assessment of Bulgarian soybean cultivars”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 35(1), 1099–1117, 2021; ISSN 1310-2818; DOI 10.1080/13102818; Q3; SJR = 0.377; IF = 1.762

Abstract

The evaluation of climate plasticity and content of free amino acids, sugars and fatty acids in Bulgarian soybean cultivars were used as an innovative approach. The field performance, expression and metabolomic profiles of leaves, green seeds and mature seeds of plants grown from low temperature pre-treated and not-treated seeds were assessed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The data from the morphological indicators, expression profiles and content of metabolites confirmed that the plants grown from low temperature pre-treated seeds had better performance. The expression profiles correlated with the content of amino acids and sugars. Inclusion of extruded full-fat soybean from cvs. Srebrina and Richy in the compound feed for pigs and soybean cake obtained after cold pressed soybeans of cv. Srebrina in compound feed for laying hens were investigated. The results confirmed that extruded full-fat soybean cv. Srebrina could be successfully included in the protein component of feed for growing pigs at a rate of 50% of soybean meal in protein equivalent. Extruded full-fat soybean cv. Richy in the amount of 30% of the protein component of the ration, in protein equivalent of the compound feed for the period of fattening of pigs could be included. The results confirmed that feed for laying hens, in which 50% of imported soybean meal is replaced by soybean cake produced from locally grown soybean, could increase the content of free amino and fatty acids of the final product and benefit the quality of eggs.

Абстракт

Оценката на климатичната пластичност и съдържанието на свободни аминокиселини, захари и мастни киселини са използвани като иновативен подход в български сортове соя. Полевото представяне, експресията и метаболомните профили на листа, зелени семена и зрели семена на растения, отгледани от предварително третирани и нетретирани семена при ниска температура, бяха оценени чрез количествена полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция в реално време (qRT-PCR) и газова хроматография/мас спектрометрия (GC/MS). Данните от морфологичните показатели, експресионните профили и съдържанието на метаболити потвърди, че растенията отгледани от предварително третирани при ниска температура семена имат по-добро представяне. Експресионните профили корелират със съдържанието на аминокиселини и захари. Изследвано е включването на екструдирана пълномаслена соя от сортовете Сребрина и Ричи във фуражи за прасета и в соево къспе, получено от студено пресована соя сорт Сребрина във фуражи за кокошки носачки. Резултатите потвърдиха, че екстудираната пълномаслена соя сорт Сребрина успешно може да се включи в протеиновия компонент на фуража за подрастващи

свине при 50% соево брашно в протеинов еквивалент. Екструдирана пълномаслена соя сорт Ричи в количество 30% от протеиновия компонент на дажбата, може да бъде включена във фуражи за периода на угодяване на свинете. Резултатите потвърдиха, че фуражът за кокошки носачки, при които 50% от вносия соев шрот е заменен с произведено соево кюспе от местно отглеждана соя, може да увеличи съдържанието на свободни аминокиселини и мастни киселини в крайния продукт и да допринесе за качеството на яйцата.

5. [B.4.5] M. Revalska, M. Radkova, L. Zagorchev, A. Iantcheva, "Functional GUS assay of GRAS transcription factor from *Medicago truncatula*", *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 1187–1194, 2019; ISSN 1310-2818; DOI 10.1080/13102818.2019.1649096; Q3; SJR = 0.376; IF = 1.186

Abstract

GRAS gene family encodes transcription factors (TFs) which plays a vital role in different processes of plant growth and development of stems and roots, phytochrome-A signal transduction (PAT), gibberellic acid signal transduction (GA), plant response to biotic and abiotic stress conditions and disease resistance. They could be induced by salt and drought stress and in response to pathogen attack. In this research we investigated the expression pattern of the gene encoding *MtGRAS TF (Medtr2g026250)* by functional GUS assay in the model legume species *Medicago truncatula*. Transcriptional reporter lines carrying the promoter region of the gene encoding *MtGRAS TF* fused to *GUS* and *GFP* reporter genes were obtained via *Agrobacterium*-transformation of suspension cultures. The activity of the GUS reporter gene was detected in various parts and tissues of T1 generation of transformed plants, as well as under salinity stress.

Абстракт

Генното семейство GRAS кодира транскрипционни фактори (TFs), които играят жизненоважна роля в различни процеси на растежа на растенията и развитието на стъблата и корените, фитохром-А сигнална трансдукция (PAT), сигнална трансдукция на гибберелинова киселина (GA), отговор на растенията към биотични и абиотични условия на стрес и устойчивост към болести. Те могат да бъдат индуцирани от солеви стрес и засушаване, както и в отговор на атака от патогени. В това проучване изследвахме модела на експресия на ген, кодиращ *MtGRAS TF (Medtr2g026250)* чрез функционален GUS анализ в моделния бобов вид *Medicago truncatula*. Линии от растения за анализ на промоторната активност, носещи промоторен регион от ген, кодиращ *MtGRAS TF*, слят с *GUS* и *GFP* маркерни гени, са получени чрез *Agrobacterium* - опосредствана трансформация на суспендиални култури. Активността на *GUS* маркерния ген беше открита в различни части и тъкани от T1 поколението на трансформирани растения, както и при солеви стрес.

6. [B.4.6] M. Radkova, M. Revalska, D. Kertikova, A. Iantcheva, “Zinc finger CCHC-type protein related with seed size in model legume species *Medicago truncatula*” *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 278–285, 2019; ISSN 1310-2818; DOI 10.1080/13102818.2019.1568914; Q3; SJR = 0.376; IF = 1.186

Abstract

Legumes are one of the world’s leading sources of nutrition, providing sustainable agriculture. They require minimal amounts of soil improvers (fertilizers) due to the ability to absorb nitrogen through symbiotic interactions with nitrogen-fixing soil microorganisms. The trend for human population growth requires an adequate growth in crop production. This directly depends on the seed size and number as well as on the leaf biomass. In turn, seed size has been the subject of selection programmers for all crops. In this study, we explored the relation between the function of the gene coding Zinc finger CCHC-type protein and flower morphology and seed size in the model legume species *Medicago truncatula*. *M. truncatula* lines with modified level of *Zinc finger CCHC* transcript and transcriptional reporters were developed and analysed by real-time polymerase chain reaction and expression of the *GUS* (b-glucuronidase) and green fluorescent protein (*GFP*) reporter genes. A tissue-specific GFP signal was detected in the anthers from overexpressing *M. truncatula* lines. The *M. truncatula* lines with knockdown expression showed direct relation between low transcription level of *Mt-Zn-CCHC* gene and strongly reduced seed size accompanied with short stems length and internodes.

Абстракт

Бобовите растения са един от водещите източници на храна в света, осигуряващ устойчиво земеделие. Те изискват минимални количества почвени подобрители (торове) поради способността си да абсорбират азот чрез симбиотични взаимодействия с азотфиксиращи почвени микроорганизми. Тенденцията за нарастване на човешката популация изисква адекватен растеж при производството на култури. Това зависи пряко от размера и броя на семената, както и от листната биомаса. От своя страна размерът на семената е обект на изследване за селекционерите при всички култури. В това проучване изследвахме връзката между функцията на ген, кодиращ протеин от типа Zinc finger CCHC и морфологията на цвета и размера на семената, в моделното бобово растение *Medicago truncatula*. Създадени са линии *M. truncatula* с модифицирано ниво на *Zinc finger CCHC* транскрипти и линии за анализ на промоторната активност, които са анализирани в реално време чрез полимеразна верижна реакция и е изследвана експресията на маркерните гени *GUS* (b-глюкуронидаза) и *GFP* (зелен флуоресцентен протеин). Беше открит тъканно-специфичен GFP сигнал в прашниците на свръхекспресирани линии *M. truncatula*. Линиите *M. truncatula* с потисната експресия показаха директна връзка между ниско ниво на транскрипция на *Mt-Zn-CCHC* гена и силно намален размер на семената, придружено със скъсена дължина на стъблото и междувъзлията.

7. [B.4.7] A. Iantcheva, M. Revalska “Early events during the induction of somatic embryogenesis in genera *Medicago*”, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 24(6), 1042–1052, 2018; ISSN 1310-0351; <https://www.agrojournals.org/24/06-15.pdf>; Q3; SJR = 0.261

Abstract

In this review based on our data obtained in last 25 years we outline the early events of the induction of somatic embryogenesis in genera *Medicago* and in the model species - diploid *M. truncatula* and tetraploid *M. falcata*. Following the collected data considerable attention is paid on the factors affecting the process of the induction, activation of somatic cells for division by using an auxin 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) as a trigger, type of first cell division and further development. Based on recently established results the role of auxin in somatic embryo development is traced and confirmed by the localization of expression of the genes encoding an auxin influx carrier (*MtLAX3*) and the transcriptional factor an auxin response factor B3 (*MtARF-B3*) from the genome of *M. truncatula*. A brief consideration is paid to the role of genotype, explant pretreatment and genome size.

Абстракт

В това ревю, базирано на наши данни, получени през последните 25 години, очертаваме ранните събития на индуциране на соматичен ембриогенез в родовете *Medicago* и в моделните видове - диплоидна *M. truncatula* и тетраплоидна *M. falcata*. След събраните данни, значително внимание се обръща на факторите, влияещи върху процеса на индукция, активиране на соматичните клетки за делене чрез използване на ауксин 2,4-D (2,4-дихлорофеноксоцетна киселина) като спусък, тип първо клетъчно делене и по-нататъшно развитие. Въз основа на наскоро установени резултати ролята на ауксина в соматичното развитие на ембриона се проследява и потвърждава от локализацията на експресията на гени, кодиращи преносител на ауксин (*MtLAX3*) и ауксин отговорен транскрипционен фактор B3 (*MtARF-B3*) от генома на *M. truncatula*. Обърнато е кратко внимание на ролята на генотипа, предварителната обработка на експланта и размер на генома.

8. [B.4.8] A. Iantcheva, I. Boycheva, **M. Revalska** “Development of root tips synchronized system for the model legume *Medicago truncatula* upon replication stress”, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21(6), 1177-1184, 2015; ISSN 1310-0351; https://www.researchgate.net/publication/290496867_Development_of_root_tips_synchronized_system_for_the_model_legume_Medicago_truncatula_upon_replication_stress#fullTextFileContent; Q3; SJR = 0.229

Abstract

Up to now the synchronized cell cultures were developed for alfalfa (*Medicago sativa*) and they served as a valuable tool for the identification and understanding of key regulators of the cell cycle. These cell culture systems were characterized with some disadvantages like continuous use of mitogenic compounds and conditions that differ from the stable physiological state in the plant meristem cells. The present procedure, described in this study is an easy and fast system for root tips synchronization of *Medicago truncatula*, upon hydroxyurea treatment. The system was originally developed for *Arabidopsis thaliana* and adapted for the model legume. The present study opens up possibility to investigate gene of interest that are involved in *Medicago truncatula* cell cycle progression.

Абстракт

Досега синхронизираните клетъчни култури бяха разработени за люцерна (*Medicago sativa*) и служеха като ценен инструмент за идентифициране и разбиране на ключови регулатори от клетъчния цикъл. Тези системи за клетъчни култури се характеризират с някои недостатъци като продължителна употреба на митогенни съединения и условия, които се различават от стабилното физиологично състояние в клетките на растителната меристема. Настоящата процедура, описана в това проучване, е лесна и бърза система за синхронизиране на коренови връхчета от *Medicago truncatula*, при третиране с хидроксиурея. Системата първоначално е разработена за *Arabidopsis thaliana* и адаптирана за моделното бобово растение. Настоящото изследване отваря възможност за изследване на интересен ген, който участва в прогресията на клетъчния цикъл при *Medicago truncatula*.

9. [B.4.9] **M. Revalska**, V. Vassileva, G. Zehirov, A. Iantcheva “Evaluation of the function and expression pattern of *Medicago truncatula* auxin response factor B3 after heterologous expression in *Arabidopsis thaliana*”, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 22(5), 783-793, 2016; ISSN 1310-0351; <https://www.agrojournal.org/22/05-14.pdf>; Q3; SJR = 0.229

Abstract

The phytohormone auxin plays a vital role in almost every aspect of plant growth and development. Expression of auxin responsive genes is controlled by a family of Auxin Response Factor (ARF)

transcription factor family. This study examined the function and expression pattern of a gene encoding Auxin Response Factor B3 from *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*) after its heterologous expression in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Stable transgenic plants with *ARF-B3* overexpression, downregulation and transcriptional reporters were constructed. Transcriptional and histochemical assays revealed a stable *MtARF-B3* expression in various stages of somatic embryogenesis and during the postembryonic development of *A. thaliana*. Morphological analysis and morphometric measurements confirmed the important role of *MtARF-B3* in general plant growth and development, root growth and seed production.

Абстракт

Фитохормонът ауксин играе жизненоважна роля в почти всеки аспект от растежа и развитието на растенията. Експресията на ауксин отговорните гени се контролира от семейство транскрипционни фактори Ауксин отговорни транскрипционни фактори (ARF). Това проучване изследва функцията и модела на експресия на ген, кодиращ ауксин отговорен транскрипционен фактор B3 (Auxin Response Factor B3) от *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*) след хетероложната му експресия в моделното растение *Arabidopsis thaliana*. Конструирани са стабилни трансгенни растения със свръхекспресия, потисната експресия и растения за анализ на промоторната активност на *ARF-B3*. Транскрипционните и хистохимичните анализи разкриха стабилна експресия на *MtARF-B3* в различни етапи от соматичния ембриогенез и по време на постембрионалното развитие на *A. thaliana*. Морфологичният анализ и морфометричните измервания потвърдиха важната роля на *MtARF-B3* в растежа и развитието на растенията, растежа на корените и производството на семена.

10. [B.4.10] M. Revalska, V. Vassileva, G. Zehirov, A. Iancheva “Analysing the function and the expression pattern of auxin response factor B3 from *Medicago truncatula* in the model plant *Lotus japonicus*”, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 22(2), 253-261, 2016; ISSN 1310-0351; <https://www.agrojournal.org/22/02-14.pdf>; Q3; SJR = 0.229

Abstract

In plants, Auxin Response Factors (ARFs) regulate gene expression in response to auxin and may act as a transcriptional activators or repressors. ARF proteins bind to auxin response elements (AuxREs) in auxin-responsive gene promoters. Auxin Response Factor B3 from *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*) was heterologously expressed in the model legume *Lotus japonicus*. Stable transgenic plants, overexpressing *MtARF-B3* and transcriptional reporters were created. In addition, *MtARF-B3* ortholog gene of *L. japonicus* was downregulated and knockdown plants were constructed. Phenotypic and morphological evaluation, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and histochemical GUS assay were used to study the function and expression pattern of *MtARF-B3* in the process of somatic embryogenesis and development of tissues and

organs. A complex analysis of the obtained results suggests that *MtARF-B3* play role in root architecture and in fertility of the model legume *L. japonicus*.

Абстракт

В растенията ауксин отговорните фактори (ARFs) регулират генната експресия в отговор към ауксин и могат да действат като транскрипционни активатори или репресори. ARF протеините се свързват към ауксин отговорен елемент (AuxREs) в промотора на ауксин отговорните гени. Ауксин отговорния фактор B3 от *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*) е хетероложно експресиран в моделното бобово растение *Lotus japonicus*. Създадени са стабилни трансгенни растения, свръхекспресиращи *MtARF-B3* и растения за анализ на промоторната активност на *MtARF-B3*. В допълнение, ортоложния ген на *MtARF-B3* от *L. japonicus* беше потиснат и бяха конструирани нокдаун растения. Фенотипна и морфологична оценка, количествена полимеразна верижна реакция в реално време (qRT-PCR) и хистохимичен GUS анализ бяха използвани за изследване на функцията и модела на експресия на *MtARF-B3* в процеса на соматичен ембриогенез и развитието на тъканите и органите. Комплексният анализ на получените резултати предполага, че *MtARF-B3* играе роля в кореновата архитектура и фертилността на моделното бобово растение *L. japonicus*.

Показател Г. Статии и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация

1. [Г.1] A. Iantcheva, M. Zhiponova, **M. Revalska**, J. Heyman, I. Dincheva, I. Badjakov, N. De Geyter, I. Boycheva, S. Goormachtig, L. De Veylder, “A common F-box gene regulates the leucine homeostasis of *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*“, *Protoplasma*, 259(2), 277–290, 2022; ISSN 0033-183X; DOI 10.1007/s00709-021-01662-w; Q1; SJR = 0.676; IF = 2.9

Abstract

The F-box domain is a conserved structural protein motif that most frequently interacts with the SKP1 protein, the core of the SCFs (SKP1-CULLIN-F-box protein ligase) E3 ubiquitin protein ligases. As part of the SCF complexes, the various F-box proteins recruit substrates for degradation through ubiquitination. In this study, we functionally characterized an *F-box* gene (*MtF-box*) identified earlier in a population of *Tnt1* retrotransposon-tagged mutants of *Medicago truncatula* and its *Arabidopsis thaliana* homolog (*AtF-box*) using gain- and loss-of-function plants. We highlighted the importance of *MtF-box* in leaf development of *M. truncatula*. Protein – protein interaction analyses revealed the 2-isopropylmalate synthase (IPMS) protein as a common interactor partner of *MtF-box* and *AtF-box*, being a key enzyme in the biosynthesis pathway of the branched-chain amino acid leucine. For further detailed analysis, we focused on *AtF-box* and its role during the cell division cycle. Based on this work, we suggest a mechanism for the role of the studied *F-box* gene in regulation of leucine homeostasis, which is important for growth.

Абстракт

F-box домейнът е консервативен структурен протеинов мотив, който най-често взаимодейства с протеина SKP1, ядрото на SCFs (SKP1-CULLIN-F-box протеинова лигаза) Е3 убиквитин протеинови лигази. Като част от комплексите SCF, различните F-box протеини набират субстрати за разграждане чрез убиквитиниране. В това проучване функционално характеризирахме F-box ген (*MtF-box*), идентифициран по-рано в популация от *Tnt1* ретротранспозон-маркирани мутанти на *Medicago truncatula* и неговия хомолог от *Arabidopsis thaliana* (*AtF-box*), използвайки растения за усилване и загуба на функцията. Подчертахме важността на *MtF-box* в развитието на листата при *M. truncatula*. Анализите на взаимодействие протеин-протеин разкриха 2-изопропилмалат синтаза (IPMS) протеин като общ интеракторен партньор на *MtF-box* и *AtF-box*, и като ключов ензим в пътя на биосинтеза на аминокиселината с разклонена верига левцин. За по-нататъшен подробен анализ се фокусирахме върху *AtF-box* и ролята му по време на цикъла на клетъчно делене. Въз основа на тази работа, ние предлагаме механизъм за ролята на изследвания *F-box* ген в регулацията на левциновата хомеостаза, която е важна за растежа.

2. [Г.2] **M. Revalska**, A. Iantcheva “Pi-starvation is mitigated in *Medicago truncatula* plants with upregulated auxin transport through auxin–strigolactone interaction”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 103(3), 405-415, 2018; ISSN 0167-6857; DOI 10.1007/s11240-018-1393-x; Q1; SJR = 0.855; IF = 2.002

Abstract

One of the most important micronutrients required for normal development of plants is phosphorus. In terms of phosphorus starvation, plants have developed plasticity for overcoming stress, expressed in the formation of shortened and thickened cluster roots. Both phytohormones auxin and strigolactone participate in the plant response associated with the phosphate signaling. The present study revealed the interaction and correlation between auxin and strigolactones in *Medicago truncatula* plants with modified auxin transport under extreme conditions of phosphate deficiency and excess. In general, drastic changes in the root architecture were observed in both overexpression and RNAi-lines. In terms of phosphate deprivation the number of lateral roots has gained and the length of main root was reduced. Relative transcript level of *MtLAX3* gene and the two strigolactone genes *MtMAX2* and *MtMAX3* was upregulated in OE/RNAi-lines and wild type plants in terms of phosphorus starvation compare to same lines in normal condition.

Абстракт

Един от най-важните микроелементи, необходими за нормалното развитие на растенията, е фосфорът. По отношение на фосфорното гладуване, растенията са развили пластичност за преодоляване на стреса, изразяваща се в образуването на скъсени и клъстеровидни корени.

И двата фитохормона ауксин и стриголактони участват в отговора на растенията, свързан с фосфатната сигнализация. Настоящото изследване разкрива взаимодействието и корелацията между ауксин и стриголактони в растения *Medicago truncatula* с модифициран ауксинов транспорт при екстремни условия на фосфатен дефицит и излишък. Общо взето драстични промени в кореновата архитектура се наблюдават както при свръхекспресия, така и при потиснатата експресия (RNAi-линии). В условия на фосфатно лишаване се увеличава броят на страничните корени и намалява дължината на главния корен. Относителното ниво на транскрипция на *MtLAX3* гена и двата стриголактонови гена *MtMAX2* и *MtMAX3* беше повишено в OE/RNAi-линиите и див тип растенията по отношение на фосфорно гладуване, в сравнение със същите линии поставени при нормални условия.

3. [Г.3] I. Boycheva, V. Vassileva, **M. Revalska**, G. Zehirov, A. Iantcheva “Different functions of the histone acetyltransferase *HAC1* gene traced in the model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*”, *Protoplasma*, 254(1), 697-711, 2017; ISSN 0033-183X; DOI 10.1007/s00709-016-0983-x; Q1; SJR = 0.834; IF = 2.457

Abstract

In eukaryotes, histone acetyltransferases regulate the acetylation of histones and transcription factors, affecting chromatin structural organization, transcriptional regulation, and gene activation. To assess the role of *HAC1*, a gene encoding for a histone acetyltransferase in *Medicago truncatula*, stable transgenic lines with modified *HAC1* expression in the model plants *M. truncatula*, *Lotus japonicus*, and *Arabidopsis thaliana* were generated by *Agrobacterium* mediated transformation and used for functional analyses. Histochemical, transcriptional, flow cytometric, and morphological analyses demonstrated the involvement of *HAC1* in plant growth and development, responses to internal stimuli, and cell cycle progression. Expression patterns of a reporter gene encoding beta-glucuronidase (*GUS*) fused to the *HAC1* promoter sequence were associated with young tissues comprised of actively dividing cells in different plant organs. The green fluorescent protein (*GFP*) signal, driven by the *HAC1* promoter, was detected in the nuclei and cytoplasm of root cells. Transgenic lines with *HAC1* overexpression and knockdown showed a wide range of phenotypic deviations and developmental abnormalities, which provided lines of evidence for the role of *HAC1* in plant development. Synchronization of *A. thaliana* root tips in a line with *HAC1* knockdown showed the involvement of this gene in the acetylation of two core histones during S phase of the plant cell cycle.

Абстракт

При еукариотите хистон ацетилтрансферазите регулират ацетилирането на хистони и транскрипционни фактори, засягащи структурната организация на хроматина, транскрипционната регулация и генното активиране. За да се оцени ролята на *HAC1*, ген кодиращ хистон ацетилтрансфераза в *Medicago truncatula*, са генерирани стабилни

трансгенни линии с модифицирана експресия на *HAC1* в моделните растения *M. truncatula*, *Lotus japonicus*, и *Arabidopsis thaliana* по метода на *Agrobacterium* - опосредстваната трансформация. Тези трансгенни линии са използвани за функционални анализи. Хистохимични, транскрипционни, флоуцитометрични и морфологични анализи показват участието на *HAC1* в растежа и развитието на растенията, отговора към вътрешни стимули, и прогресията на клетъчния цикъл. Експресионният път на маркерния ген, кодиращ бета-глюкуронидаза (*GUS*), слят с *HAC1* промоторната последователност беше асоцииран с млади тъкани съставени от активно делящи се клетки в различни растителни органи. Сигналят на зеления флуоресцентен протеин (*GFP*), под контрола на *HAC1* промотор, се открива в ядрата и цитоплазмата на клетки в корена. Трансгенни линии със свръхекспресия и нокдаун на *HAC1* показват широк спектър от фенотипни отклонения и аномалии в развитието, които предоставиха доказателства за ролята на *HAC1* в развитието на растенията. Синхронизация на коренови връхчета от *A. thaliana* в една линия с нокдаун на *HAC1* показва участието на този ген в ацетилирането на два ядрени хистона по време на S фазата на растителния клетъчен цикъл.

4. [Г.4] **M. Revalska**, V. Vassileva, G. Zehirov, S. Goormachtig, A. Iantcheva “Assessment of the function and expression pattern of auxin response factor B3 in the model legume plant *Medicago truncatula*”, Turkish journal of Biology, 41, 66-76, 2017; ISSN 1300-0152; DOI 10.3906/biy-1602-36; Q2; SJR = 0.288; IF = 0.651

Abstract

The phytohormone auxin is a critical signal molecule, regulating fundamental processes in plant growth and development, such as shaping the root and shoot architecture, organ patterning, and nodulation. Auxin regulates plant gene expression mainly through auxin response factors (ARFs), which bind to auxin response elements in the promoter, upstream of auxin-activated genes. Here we examine and assess the function and expression pattern of a gene described as an auxin response factor, containing a DNA binding pseudobarrel and B3 DNA-binding domains, from *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*). For the model legume species *M. truncatula*, stable transgenic plants with *MtARF-B3* overexpression, downregulation, and transcriptional reporters were constructed. Phenotypic and morphological evaluation of the obtained transgenic plants confirmed the important role of *MtARF-B3* in general plant growth and development, modeling of root architecture, and development of seeds. Detailed histochemical and transcriptional analysis revealed expression of the gene in various stages of somatic embryogenesis, during formation of plant organs and tissues, and symbiotic nodulation. The fact that *MtARF-B3* was strongly expressed in stamens and pollen grains in *M. truncatula* suggests that this gene could play a role in the fertility of this model legume.

Абстракт

Фитохормонът ауксин е критична сигнална молекула, регулираща основните процеси в растежа и развитието на растенията, като оформяне на кореновата архитектура и надземните части, моделиране на органите и нодулиране (грудкообразуване). Ауксинът регулира главно експресията на растителни гени чрез ауксин отговорни фактори (ARFs), които се свързват с ауксин отговорни елементи в промотора, преди ауксин-активираните гени. Тук изследваме и оценяваме функцията и модела на експресия на ген, описан като ауксин отговорен фактор, съдържащ ДНК-свързващ псевдобарел (pseudobarrel) и ВЗ ДНК-свързващи домени, от *Medicago truncatula* (*MtARF-B3*). За моделният вид бобово растение *M. truncatula* бяха конструирани стабилни трансгенни растения със свръхекспресия и потисната експресия на *MtARF-B3*, както и растения за анализ на промоторната активност на *MtARF-B3*. Фенотипната и морфологичната оценка на получените трансгенни растения потвърждава важната роля на *MtARF-B3* в растежа и развитието на растенията, моделиране на кореновата архитектурата и развитието на семена. Подробни хистохимични и транскрипционни анализи разкриват експресията на гена в различни етапи на соматичния ембриогенез, по време на формирането на растителните органи и тъкани и симбиотичното грудкообразуване. Фактът, че *MtARF-B3* е силно експресиран в тичинките и поленовите зърна в *M. truncatula* предполага, че този ген може да играе роля във фертилността на този модел бобово растение.

5. [Г.5] **M. Revalska**, M. Radkova, A. Iantcheva, “Functional characterization of *Medicago truncatula* GRAS7, a member of the GRAS family transcription factors, in response to abiotic stress“, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 36(1), 317–326, 2022; ISSN 1310-2818; DOI 10.1080/13102818.2022.2074893; Q3; SJR = 0.317; IF = 1.4

Abstract

Transcriptional factors play an essential role in the regulation of developmental processes in plants. GRAS family transcription factors are plant specific, and GRAS members possess multiple functions involved in plant growth and in response to abiotic and biotic stress. The members are divided into several subgroups. This study is focused on one particular member, *MtGRAS7*, which belongs to the PAT subgroup. Based on constructed stable transgenic plants with a gain and loss of function of *MtGRAS7*, the phenotype of transgenic plants was described compared to control wild-type *Medicago truncatula*. The involvement of the gene in the response to abiotic stress – drought (350 mmol/L mannitol), salinity (150 mmol/L NaCl) and cold (temperature of 4 °C), was analyzed and its transcript level was detected in leaves and nodules at different time points during the exposure to stress and after the stress. The overexpression of the gene benefits plant during the stress and later on in the recovery period.

Абстракт

Транскрипционните фактори играят съществена роля в регулирането на процесите на развитие на растения. Транскрипционните фактори от семейството на GRAS протеините са специфични за растенията и притежават множество функции, участващи както в растежа на растенията, така и в отговора към абиотичен и биотичен стрес. Членовете на това генно семейство са разделени на няколко подгрупи. Това проучване е фокусирано върху един конкретен член, *MtGRAS7*, който принадлежи към подгрупата PAT. Въз основа на конструирани стабилни трансгенни растения със засилена и загубена функция на *MtGRAS7*, фенотипът на трансгенните растения беше описан в сравнение с контролни див тип растения от *Medicago truncatula*. Анализирани са участите на гена в отговора към абиотичен стрес – засушаване (350 mmol/L манитол), засоляване (150 mmol/L NaCl) и студ (температура на 4 °C). Също така беше анализирано, и неговото транскрипционно ниво в листа и нодули в различни времеви точки по време на излагане на стрес и след стреса. Свърхекспресията на гена е от полза за растенията по време на стреса и по-късно в периода на възстановяване.

6. [Г.6] M. Zhiponova, K. Morohashi, I. Vanhoutte, K. Machemer-Noonan, **M. Revalska**, M. Van Montagu, E. Grotewold, E. Russinova “Helix-loop-helix/basic helix-loop-helix transcription factor network represses cell elongation in *Arabidopsis* through an apparent incoherent feed-forward loop”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(7), 2824-9, 2014; ISSN 1091-6490; DOI 10.1073/pnas.1400203111; Q1; SJR = 6.898; IF = 9.674

Abstract

Cell elongation is promoted by different environmental and hormonal signals, involving light, temperature, brassinosteroid (BR), and gibberellin, that inhibit the atypical basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH1 (IBH1). Ectopic accumulation of IBH1 causes a severe dwarf phenotype, but the cell elongation suppression mechanism is still not well understood. Here, we identified a close homolog of IBH1, IBH1-LIKE1 (IBL1), that also antagonized BR responses and cell elongation. Genome-wide expression analyses showed that IBH1 and IBL1 act interdependently downstream of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1)-PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)-DELLA module. Although characterized as non-DNA binding, IBH1 repressed direct IBL1 transcription, and they both acted in tandem to suppress the expression of a common downstream helix-loop-helix (HLH)/bHLH network, thus forming an incoherent feed-forward loop. IBH1 and IBL1 together repressed the expression of PIF4, known to stimulate skotomorphogenesis synergistically with BZR1. Strikingly, PIF4 bound all direct and down-

regulated HLH/bHLH targets of IBH1 and IBL1. Additional genome-wide comparisons suggested a model in which IBH1 antagonized PIF4 but not the PIF4–BZR1 dimer.

Абстракт

Клетъчното удължаване се насърчава от различни екологични и хормонални сигнали, включващи светлина, температура, брасиностероиди (BR) и гибберелин, които инхибират атипичния basic helix–loop–helix (bHLH) транскрипционен фактор INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH1bHLH1 (IBH1). Ектопичното натрупване на IBH1 причинява тежък фенотип на джудже, но механизмът за потискане на клетъчното удължаване все още не е добре разбран. Тук идентифицирахме близък хомолог на IBH1, IBH1-LIKE1 (IBL1), който също антагонизира BR реакции и клетъчното удължаване. Експресионни анализи в целия геном показаха, че IBH1 и IBL1 действат взаимозависимо надолу по веригата на BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1)–PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)–DELLA модул. Въпреки че се характеризира като не-ДНК свързване, IBH1 потиска директната IBL1 транскрипция и двата транскрипционни фактора действат в тандем, за да потиснат експресията на общата мрежа helix–loop–helix (HLH)/bHLH надолу по веригата, като по този начин се образува некохерентна верига за подаване напред. IBH1 и IBL1 заедно потискат експресията на PIF4, за който е известно, че стимулира скотоморфогенезата синергично с BZR1. Поразително е, че PIF4 обвързва всички директни и даун регулирани HLH/bHLH цели на IBH1 и IBL1. Допълнителни сравнения в целия геном предполагат модел, в който IBH1 антагонизира PIF4, но не и димера PIF4–BZR1.

7. [Г.7] **M. Revalska**, V. Vassileva, S. Goormachtig, T. Van Hautegeem, P. Ratet, A. Ianctheva “Recent progress in development of a *Tnt1* functional genomics platform for the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* in Bulgaria”, *Current Genomics* 12, 147-152, 2011; ISSN 1389-2029; DOI 10.2174/138920211795564313; Q2; SJR = 1.332; IF = 2.408

Abstract

Legumes, as protein-rich crops, are widely used for human food, animal feed and vegetable oil production. Over the past decade, two legume species, *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, have been adopted as model legumes for genomics and physiological studies. The tobacco transposable element, *Tnt1*, is a powerful tool for insertional mutagenesis and gene inactivation in plants. A large collection of *Tnt1*-tagged lines of *M. truncatula* cv. Jemalong was generated during the course of the project ‘GLIP’: Grain Legumes Integrated Project, funded by the European Union (www.eugrainlegumes.org). In the project ‘IFCOSMO’: Integrated Functional and COmparative genomics Studies on the MOdel Legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, supported by a grant from the Ministry of Education, Youth and Science, Bulgaria, these lines are used for

development of functional genomics platform of legumes in Bulgaria. This review presents recent advances in the evaluation of the *M. truncatula Tnt1* mutant collection and outlines the steps that are taken in using the *Tnt1*-tagging for generation of a mutant collection of the second model legume *L. japonicus*. Both collections will provide a number of legume-specific mutants and serve as a resource for functional and comparative genomics research on legumes. Genomics technologies are expected to advance genetics and breeding of important legume crops (pea, faba bean, alfalfa and clover) in Bulgaria and worldwide.

Абстракт

Бобовите растения, като богати на протеини култури, се използват широко за храна на хората, храна за животни и производство на растително масло. През последното десетилетие два вида бобови растения, *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, бяха приети като моделни бобови растения за геномни и физиологични изследвания. Преносимият елемент от тютюн, *Tnt1*, е мощен инструмент за инсерционна мутагенеза и гена инактивация в растенията. Голяма колекция от *Tnt1* - маркирани линии на *M. truncatula* cv. Jemalong беше генерирана по време на проекта „GLIP“: GRAIN LEGUMES integrated project, финансиран от Европейския съюз (www.eugrainlegumes.org). В проектът „IFCOSMO“: Интегрирана, функционална и сравнителна геномика при моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, подкрепен с грант от МОН, България, тези линии се използват за разработване на платформа за функционална геномика на бобови растения в България. Това ревю представя последните постижения в оценката на *Tnt1* мутантната колекция от *M. truncatula* и очертава стъпките, които са взети при използване на *Tnt1*-маркиране за генериране на мутантна колекция от второ моделно бобово растение *L. japonicus*. И двете колекциите ще предоставят редица специфични за бобовите растения мутанти и ще служат като ресурс за функционални и сравнителни геномни изследвания върху бобовите растения. Очаква се геномните технологии да усъвършенстват генетиката и развъждането на важни бобови култури (грах, боб, люцерна и детелина) в България и по света.

8. [Г.8] - V. Vassileva, G. Zehirov, **M. Ugrinova**, A. Iantcheva “Variable leaf epidermal morphology in *Tnt1* insertional mutants of the model legume *Medicago truncatula*”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24(4), 2060-2065, 2010; ISSN 1310-2818; DOI; 10.2478/v10133-010-0086-3; Q3; SJR = 0.189; IF = 0.503

Abstract

In this report some typical leaf morphological characteristics of *M. truncatula* mutants generated by a *Tnt1* retrotransposon insertion mutagenesis were evaluated and summarized. It was found that all the examined leaf epidermal parameters were strongly influenced in the *Tnt1* mutant lines. Epidermal cells varied in shape and size, and diversified in the patterns of cell walls. Although the

leaves of all mutant plants were amphistomatic, stomata were more abundant at the lower (abaxial) leaf surfaces than the upper (adaxial) leaf surfaces. On the other hand, the number of stomata on both leaf surfaces varied widely among different *Tnt1* lines. Based on these observations, we conclude that most of the observed mutant phenotypes were caused by the *Tnt1* insertions. In addition, the evaluated leaf epidermal features can be reliably applied for phenotypic profiling of *M. truncatula* mutant lines. Morphological variables in leaf epidermis in all the screened mutants demonstrated that *Tnt1* is a very efficient mutagen, confirming that *Tnt1* gene tagging strategy is one of the most valuable systems for legume functional genomics.

Абстракт

В този доклад някои типични морфологични характеристики на листата на мутанти от *M. truncatula*, генерирани чрез *Tnt1* ретротранспозонна инсерционна мутагенеза бяха оценени и обобщени. Установено е, че всички изследвани параметри на листния епидермис са силно повлияни в *Tnt1* мутантните линии. Епидермалните клетки варират по форма и размер и са разнообразни в моделите на клетъчните стени. Въпреки, че листата на всички мутантни растения са амфистоматични, устицата са по-изобилни в долната (абаксиална) листна повърхност, всравнение с горната (адаксиална) повърхност на листата. От друга страна, броят на устицата на двете листни повърхности варира в широки граници сред различни *Tnt1* линии. Въз основа на тези наблюдения, ние заключаваме, че повечето от наблюдаваните мутантни фенотипове са причинени от *Tnt1* инсерцията. В допълнение, оценените епидермални характеристики на листата могат надеждно да се приложат за фенотипно профилиране на мутантни линии *M. truncatula*. Морфологичните променливи в епидермиса на листата при всички скринирани мутанти показват, че *Tnt1* е много ефективен мутаген, потвърждавайки, че стратегията за маркиране на *Tnt1* гена е една от най-ценните системи за функционална геномика при бобовите растения.

Показател Г. Статии и доклади, публикувани в нереферирани списания с научно рецензиране или публикувани в редактирани колективни томове

9. [Г.9] **M. Revalska**, A. Iantcheva, “Auxin and stringolactone interaction in extreme phosphate conditions“, In Book: Agricultural Biocatalysis: Biological and Chemical Applications, 215–248, 2022; ISBN 978-100063528-7, 978-100331314-4; <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003313144-10/auxin-stringolactone-interaction-extreme-phosphate-conditions-miglana-revalska-anelia-iantcheva>

Abstract

Hormonal crosstalk between auxin and strigolactones regulates plant development and can fine-tune the root system. The extreme conditions of phosphate deficiency and excess caused drastic changes in the root architecture of *Medicago truncatula* *LAX3* transgenic and wild type (WT)

plants. *M. truncatula* overexpressed lines (MtLAX3-OE) were characterized by high plasticity of surviving phosphorus starvation, due to the significant increase in lateral root number (LRN) and the relative expression level of *MtLAX3*, *MtMAX2*, and *MtMAX3* genes. The application of 7-days treatment with synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) led to dramatic stimulation of the LRN in the transgenic and WT plants, where high inorganic phosphate (Pi) concentration in culture media together with the auxin could save the phenotype for the knockdown lines (*MtLAX3-RNAi*). Both transgenic lines and WT plants were characterized by high plasticity of surviving phosphorus starvation or excess, after exogenous application of 2,4-D, due to the significant increase in LRN and the relative expression level of *MtLAX3* and *MtMAX2* in roots. The results presented in the chapter strongly contributed to understanding the interaction between auxin and strigolactones, their function in plant growth and development. This obtained knowledge could be used to optimize the crop growth of legumes in eroded and poor phosphate soils.

Абстракт

Хормоналното взаимодействие между ауксин и стриголактони регулира развитието на растенията и може да настрои фино кореновата система. Крайните състояния на дефицит и излишък на фосфати причиняват драстични промени в кореновата архитектура на *LAX3* трансгенни и див тип (WT) растения от *Medicago truncatula*. Свърхекспресиранияте линии (*MtLAX3-OE*) от *M. truncatula* се характеризират с висока пластичност на оцеляване при фосфорно гладуване, поради значителното увеличение в броя на страничните корени (LRN) и относителното ниво на експресия на *MtLAX3*, *MtMAX2* и *MtMAX3* гените. Прилагането на 7 дневно третиране със синтетичен ауксин 2,4-дихлорфеноксиоцетна киселина (2,4-D) доведе до драматична стимулация на LRN в трансгенните и WT растения, където високата концентрацията на неорганичен фосфат (Pi) в хранителната среда заедно с ауксина може да спаси фенотипа на нокдаун линиите (*MtLAX3-RNAi*). И двете трансгенни линии и WT растенията се характеризират с висока пластичност на оцеляване при фосфорно гладуване или излишък след екзогенно приложение на 2,4-D, поради значителното увеличение на LRN и относителното ниво на експресия на *MtLAX3* и *MtMAX2* в корените. Резултатите представени в главата от книга силно допринесоха за разбиране взаимодействието между ауксина и стриголактоните, и тяхната функция в растежа и развитието на растенията. Това получено знание може да се използва за оптимизиране растежа на бобовите култури в ерозирани и бедни на фосфати почви.

10. [Г.10] A. Iantcheva, **M. Revalska**, “*Agrobacterium tumefaciens* transformation of *Medicago truncatula* cell suspensions, in Book: The Model Legume *Medicago truncatula*“, 1162–1169, 2019; ISBN 978-111940914-4, 978-111940915-1; DOI 10.1002/9781119409144.ch149

[Г.10] е глава от книга, в която е представен иновативен протокол за трансформация на суспендиални култури от *Medicago truncatula*. Експресията на маркерни гени под контрола на ендогенни промотори на различни гени се идентифицират бързо и лесно. Този протокол дава възможност за създаване на стабилни трансгенни растения, произхождащи от една или няколко соматични клетки.

В публикуваната глава от книга няма резюме. Поради тази причина са представени заключителните резултати и изводи.

In conclusion the use of cell suspension culture offers the possibility for multiple investigations in the area of plant physiology, biochemistry, cellular, and molecular biology. The developed protocol for efficient cell suspension transformation is a base for production of fertile stable transformed *M. truncatula* plants. Plant system biology approaches for the model legume *M. truncatula* and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of cell suspension cultures provide an opportunity for functional genomics studies and understanding legume development. Taking advantage of high-throughput imaging techniques, a homogeneous population of transformed cells and clusters opens up possibilities for cellular and sub-cellular localization of the expression of the investigated gene of interest.

В заключение, използването на клетъчни суспендиални култури предлага възможност за множество изследвания в областта на физиологията на растенията, биохимия, клетъчна и молекулярна биология. Разработеният протокол за ефективна трансформация на клетъчна суспензия е база за производство на фертилни стабилни трансформанти от *M. truncatula*. Подходи от растителната системна биология за моделното бобово растение *M. truncatula* и ефективната *Agrobacterium* - опосредствана трансформацията на клетъчни суспендиални култури предоставя възможност за изследвания в областта на функционалната геномика и разбиране развитието на бобовите растения. Възползвайки се от високо технологичните техники за изображения, хомогенна популация от трансформирани клетки и клъстери отварят възможности за клетъчно и субклетъчно локализиране на експресията на изследвания ген.

