

Справка за оригиналните приноси в научните трудове на гл. ас. д-р Миглена Николова Ревалска отдел „Функционална генетика, абиотичен и биотичен стрес“, АгроБиоИнститут, ССА, включени 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

А. Приноси с фундаментална научна стойност.

1. Функционална генетика и геномика на моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* – клониране на гени, генетична трансформация и ин витро размножаване на растителни култури

1.1. Създаване на платформа по функционална генетика и геномика на моделни бобови растения

- В рамките на проект GRAIN LEGUMES integrated project – GLIP, финансиран по Шеста рамкова програма на Европейския съюз беше създадена мутантна колекция от *Medicago truncatula* на базата на ретроинсерционен *Tnt1* инсерционен мутагенез (Iantcheva et al. 2009, B&BE, [B.4.1]). Случайно подбрани мутантни линии бяха скринирани чрез транспозон-дисплей с цел потвърждаване присъствието на нови копия от *Tnt1* в генома на *M. truncatula*. Част от новооткритите инсерции бяха секвенирани и се установи, че някои от тях са локализирани в кодиращите последователности на различни гени. Създаването на колекция от мутантни линии на *M. truncatula* и *Lotus japonicus* в Агробиоинститут чрез използването на *Tnt1* ретроинсерционен позволи идентифицирането на нови гени, чиято функция беше проучена чрез методите на обратната генетика (Vassileva et al. 2010, B&BE, [Г.8]; Revalska et al. 2011, Curr Gen, [Г.7]). От генома на моделното растение *M. truncatula* бяха клонирани 7 гена и техните промотори. Шест от тези гени са подложени на различни анализи за определяне на тяхната функция и роля в растежа и развитието на *M. truncatula* и моделните растения *L. japonicus* и *Arabidopsis thaliana*, след хетероложна експресия в генома на тези растения.
- През 2010 г по време на докторантурата на гл. ас. д-р Ревалска, във връзка с проект “Интегрирана, функционална и сравнителна геномика при моделните бобови

растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*” ДО 02/268 от 2008, финансиран от ФНИ, беше извършена едномесечна специализация за обучение на тема "Изготвяне на конструкции за инактивиране на генната експресия по метода на RNAi", в Департамент по Растителна системна биология, Фламандски институт по биотехнологии, Гент, Белгия, под ръководството на проф. Софи Гурманчик. Престоят там беше свързан с изготвянето на конструкции за инактивиране на изследваните по проекта гени чрез метода на РНК-интерференция. Впоследствие, клонирането на изследваните гени беше осъществено чрез Gateway™ (Invitrogen) технология във вектор за заглушаване pK7GWIWG2D(II) (Hairpin RNA expression vector) като за матрица беше използвана ДНК от *M. truncatula*. Генните конструкции бяха въведени в *Agrobacterium tumefaciens* C58C51 и *A. rhizogenes* Arqual с цел трансформация на див тип растения.

- Групата по Функционална генетика – бобови е разпознаваема в международните изследователски колективи благодарение на дългогодишните изследвания свързани с моделното растение *M. truncatula*. В тази връзка, беше отправена покана към проф. Янчева и колектив за написване на глава от второто издание на наричник посветен на моделното растение при бобови. “*Agrobacterim tumefaciens* transformation of *Medicago truncatula* Cell Suspensions” In: *Model legume Medicago truncatula* (Iantcheva and Revalska 2019, [Г.10]) е главата от книга, в която е представен иновативен протокол за трансформация на суспендиални култури от *M. truncatula*. Експресията на маркерни гени под контрола на ендеогенни промотори на различни гени се идентифицират бързо и лесно. Този протокол дава възможност и за създаване на стабилни трансгенни растения произхождащи от една или няколко соматични клетки.

1.2. Функционални изследвания на гени

- *MtARF-B3* - ауксин отговорен транскрипционен фактор B3 (*ARF B3*) от *M. truncatula* е ген, чиято функция е обстойно изследвана още от времето на докторската дисертация на д-р Ревалска. Функцията на гена е проследена в генома на трансгенни (с модифицирана експресия) и контролни растения в моделните видове *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana* (Revalska et al. 2016a, *BJAS*, [B.4.9]; Revalska et al. 2016b,

BJAS, [B.4.10]; *Revalska et al. 2017, Turkish journal of Biology*, [Г.4]). Сравнен е фенотипът на трансгенните и контролни растения, анализирана е промяната в генната експресия, отчетен е броя на образуваните симбионтни грудки (при *M. truncatula*) и семена. В хода на експерименталната дейност е установено, че потискане експресията на *MtARF-B3* води до некротизиране и абортиране на цветовете при *M. truncatula* и *L. japonicus*. Те остават стерилни и не се образуват семена. При растенията с потиснатата експресия от *A. thaliana* се наблюдава намалено семеобразуване.

- ***MtLAX3*** - кодира трансмембранен ауксинов преносител *LAX3* от *M. truncatula*. Неговата функция също е проучена подробно по време на докторската дисертация на д-р Ревалска. През 2016 г беше спечелен проект в Конкурс за финансиране на научни изследвания на млади учени – 2016, финансиран от ФНИ към МОН - “Кръстосано взаимодействие между ауксин и стриголактони в растения *Medicago truncatula* с модифициран ауксинов транспорт”, ръководител гл. ас. д-р Миглена Ревалска. Един от изследваните гени в това проучване е *MtLAX3*, където е разгледана неговата функция във връзка с взаимодействието му с растителните хормони стриголактони. В публикацията *Revalska and Iantcheva 2018, PCTOC* [Г.2] са представени част от резултатите по проекта. Установена е връзката в сигналните пътища на ауксини и стриголактони и е проследена експресията както на *LAX3* гена, така и на ключови гени от синтеза на стриголактоните в условия на фосфорно гладуване или излишък на фосфор. В главата от книга “*Auxin and stringolactone interaction in extreme phosphate conditions*“, *In Book: Agricultural Biocatalysis: Biological and Chemical Applications* (*Revalska and Iantcheva 2022*, [Г.9]) са описани и систематизирани резултатите от взаимодействието между ауксина и стриголактоните в условия на екстремно съдържание на фосфор в средата. Предстои публикуване на останалите резултати, получени по проекта.
- ***MtGRAS*** – В рамките на ръководеният от д-р Ревалска проект “Функционални и биоинформатични анализи на *GRAS* транскрипционни фактори свързани с отговора към абиотичен и биотичен стрес при едногодишна (*Medicago truncatula*) и многогодишна (*Medicago sativa*) люцерна“, ДН16/9 е изследван транскрипционния фактор *GRAS*. Получените резултати са обобщени в две публикации *Revalska et al.*

2019, *B&BE* [B.4.5] и *Revalska et al. 2022, B&BE* [Г.5]. В публикациите е демонстрирано, че *MtGRAS7* участва в отговора към абиотичен стрес като засушаване, засоляване и студ. Свърхекспресията на гена е от полза за растението по време на излагане на стрес и по време на периода на възстановяване след третиране със стресови фактори.

- ***Zinc finger CCHC-type protein*** – В рамките на проекта ДН 16/10 „Транскриптомни и метаболомни изследвания на гени участващи в процесите на зреене на семената и нодулирането при бобови”, където д-р Ревалска е участник, е изследвана функцията и е локализирана генната експресия на ген, кодиращ транскрипционен фактор *Zinc finger CCHC-type protein*. Получените резултати са систематизирани в публикациите *Radkova et al. 2019, B&BE* [B.4.6] и *Radkova et al. 2021, B&BE* [B.4.3]. Една от основните функции на изследвания ген е участието му в процеса на семеобразуване. Наблюдава се промяна в размера на семената при трансгенните растения - по-големи при свърхекспресиращите и по-малки при линиите с потисната експресия. Този резултат води до повишен интерес в изследването на *Zinc finger CCHC-type protein* при икономически важната селскостопанска култура соя.
- **ген кодиращ *F-box* растителен протеин** – в публикацията *Iantcheva et al. 2022, Protoplasma* [Г.1] са описани резултатите получени при изследването на *F-box* ген, кодиращ растителен протеин в генома на *M. truncatula* и *A. thaliana*. Този протеин се включва в комплекс отговорен за разграждането на ензим, участващ в биосинтеза на разклонената аминокиселина левцин. Хомеостазата на левцина се променя в зависимост от свърхекспресията или потискането на експресията на *F-box* гена в трансгенни растения от *M. truncatula* и *A. thaliana*. Вследствие се наблюдават отклонения във фенотипа на изследваните трансгенни растения. Подобни изследвания могат да се приложат и при фуражните бобови култури като соя и люцерна, важни за изхранването на селскостопанските животни.
- ***HAC1*** - генът кодиращ хистон ацетилтрансфераза е проучен както при *M. truncatula*, така и след хетероложната му експресия в генома на *L. japonicus* и *A. thaliana*. Функцията на изследвания ген е обобщена в *Boycheva et al. 2017, Protoplasma* [Г.3]. *HAC1* участва в процесите на растеж на растенията *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana* и ацетилирането на хистоните в S фаза на клетъчния цикъл. Генът е

локализиран в активно делящи се клетки на растителните тъкани, като е установено, че експресията му се инхибира след третиране с куркумин.

- Ревюто *Iantcheva and Revalska 2018, BJAS* [B.4.7] очертава ранните събития при индуцирането на соматичен ембриогенез при родовете *Medicago* и в моделните видове диплоидна *M. truncatula* и тетраплоидна *M. falcata*. Синтетичният ауксин 2,4-D се използва като спусък, тип първо клетъчно делене и по-нататъшно развитие, в процеса на индукция и активиране на соматичните клетки за делене. Проследява се и се потвърждава локализирането на експресията на гените, кодиращи ауксинов преносител *MtLAX3* и ауксинов отговорен транскрипционния фактор В3 (*MtARF-B3*) от генома на *M. truncatula*.

2. Растителна системна биология и *Arabidopsis thaliana* като моделно растение, брасиностероиди

Резултатите, публикувани в статията *Zhiponova et al. 2014, PNAS* [Г.6] са свързани с част от работата на д-р Ревалска по време на специализацията по изработване на магистърска дипломна работа по програма Сократ-Еразъм; група Брасиностероиди, Департамент по Растителна Системна Биология, Фламандски институт по Биотехнологии, съвместно с Университет на Гент, Гент, Белгия; тема “Модулиране на растителния растеж чрез GSK-3 кинази”. В публикацията обект на изследване са транскрипционните фактори basic helix–loop–helix (bHLH)/helix–loop–helix (HLH), регулиращи клетъчното удължаване. Идентифициран е негативен регулатор на брасиностероидната сигнализация и клетъчното удължаване - IBL1, близък хомолог на IBH1. Резултатите предполагат, че IBH1 и IBL1 са част от PIF4 центъра и играят роля във фината настройка на брасиностероид-медираното клетъчно удължаване.

3. Изследвания свързани с клетъчния цикъл при растенията

Публикуваните резултати *Iantcheva et al. 2015, BJAS* [B.4.8], представят бърза и лесна система за синхронизиране на коренови връхчета от *M. truncatula*, чрез прилагане на репликативен стрес с хидрокси урея. Системата първоначално е разработена за *A. thaliana* и е адаптирана за моделното бобово растение. Методът дава възможност за проследяване експресията на Cyclin like F-box гена, участващ в прогресията на клетъчния цикъл при *M. truncatula*.

Б. Оригинални приноси с научно-приложна стойност

1. Соята като обект на изследвания

Проектът “Legumes translated” финансиран от програма Хоризонт на ЕС и Националната Научна Програма “Храни“ Компонент 1, Работен пакет 1.3., в които гл. ас. д-р Ревалска участва предоставиха възможност за пренасочване на интереса от изцяло фундаментална, към приложна наука, където обект на изследване да бъде соята. Направени са анализи свързани с икономически важната култура соя като ценен източник на растителен протеин във фуражите. Създаден е иновативен подход за оценка на българските сортове соя. Резултатите са представени в публикацията *Iantcheva et al. 2021, B&BE* [B.4.4]. Изследвани са нови диети при прасета включващи екструдирана соя от български сортове, която замества вносия соев шрот от 30 до 50%. В резултат, свободните радикали в кръвната плазма на животните намаляват, както и нивото на стрес предизвикан от диетата. Друго изследване е свързано с участието на соево кюспе произведено от българска соя, включено във фуража на кокошки носачки до 50%. Това води до повишаване на свободните аминокиселини и мастни киселини в жълтъка и белтъка на яйцата, което от своя страна повишава и хранителната стойност на тези яйца.

В допълнение семена от соя са третирани при ниски температури за продължителен период от време преди засяване на полето. Изследвана е експресията на гени, участващи в отговора към абиотичен стрес и транспорта на аминокиселини. Установена е взаимовръзка между нивото на експресия на проучваните гени и количествата захари и аминокиселини. Дълготрайната предварителна обработка при ниска температура на соевите семена подобрява производителността на растенията и съдържанието на свободни метаболити – аминокиселини, мастни киселини и захари. Резултатите от тези тригодишни изследвания са представени в публикация *Naydenova al. 2022, VJAS* [B.4.2].

В конкурсът за заемане на академична длъжност „Доцент” са представени общо 20 научни труда, от които 18 публикации (Q1 – 4; Q2 – 2; Q3 – 11; Q4 – 1) с общ IF = 27.396 (по WoS), общ SJR = 14.194 (по Scopus), както и 2 глави от книги. Всички те са публикувани в научни списания, които са реферирани и индексирани в SCOPUS и/или Web of Science. Общият брой цитирания, без самоцитирания е 85 (по Scopus).