

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
АГРОБИОИНСТИТУТ - СОФИЯ

ДОЦ. Д-Р АНЕЛИЯ ВЕНЕВА ЯНЧЕВА

Роля на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana* в изследванията по растителна биотехнология и функционална геномика на Бобови

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР НА НАУКИТЕ” ПО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3 БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ

София

2019

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДСЕ- директен соматичен ембриогенез

ИСЕ- индиректен соматичен ембриогенез

2.4-D - 2.4-дихлорфенокси-оцетната киселина

IAA - индолилacetна киселина Cb - карбеницилин

NAA - α -нафтил-оцетната киселина

TDZ- 1-phenyl-3- (1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea, thidiazuron- ТДЗ тидиазурон

PAT - полярен ауксинов транспорт

Nod фактори - специфични сигнални липохитинолигозахаридни молекули

Gm - гентамицин

Km - канамицин

Rif - рифампицин

Sp - спектомицин

GFP - маркерен ген за зелен флуоресцентен протеин

GUS - маркерен ген за β -глюкуронидазна активност

OE линии - линии със свръхекспресия

RNAi линии - линии с подтисната експресия

amiRNA линии - линии с подтисната експресия

qRT-PCR - *количествен PCR в реално време*

HU-хидроксиурея

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool – Основна търсачка за търсене и сравняване на секвенции

NCBI - National Center for Biotechnology Information-Национален Център за Биотехнологична информация

TD – Transposon display /транспозонен дисплей/

IPCR- Inverse PCR /обратен PCR/

TAP- Tandem Affinity Purification /Тандемно афинитетно пречистване/

BiFC- Bimolecular Fluorescent Complimentation /Бимолекулното флуоресцентно допълван

УВОД

Основен принос на бобовите култури за устойчиво селско стопанство и азотен цикъл, е способността им да фиксират атмосферен азот в земеделските екосистеми. Този процес се осъществява с помощта на специализирани органи, коренови грудки в симбиоза със специфични почвени бактерии, от род *Rhizobium*. Способността на бобовите растения да влизат в симбиоза с азот фиксиращи бактерии им осигурява уникално предимство в сравнение с други растителни видове.

Семейство бобови включва разнообразие от растения с висока икономическа стойност - соя, люцерна, детелина, грах, фъстъци и други зърнени и фуражни бобови. За съжаление, тези икономически важни култури имат големи полиплоидни геноми, които са трудни за изучаване на молекулно и генетично ниво. Основните открития в биологията се основават на, моделните растителни видове, а знанието натрупано при тези видове може да бъде пренесено при културните растения. Моделните растения са ценни за растителните биолози, защото са податливи на тъканно култивиране, притежават проста организация на генома и къс цикъл на развитие, както и наличието на множество генетични и геномни подходи приложими за тях.

През изминалите две десетилетия моделните видове *M. truncatula* и *L.japonicus* са утвърдени за молекулярни генетични и биохимични изследвания. Натрупаните знания при моделните бобови и моделно растение за растителната биология *Arabidopsis thaliana* са източник на полезна информация за подобряването на селскостопански култури. Развитието на модерните направления в биологията - геномика, протеомика, метаболомика, известни сборно като “омики” е комбиниран научен подход, който се прилага в световен мащаб. Геномиката анализира генетичната информация, кодирана в геномите на живите същества, което дава перспективи за дешифриране на тази информация и използването и в полза на човека.

Геномиката на бобови растения е сравнително ново научно направление, в което основни обекти на изследване са две моделни бобови растения - *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, както и моделното растение *Arabidopsis thaliana*. В България проучванията върху *M. truncatula* започват с участието на АгробиоИнститут (АБИ) в проект по Пета рамкова програма на Европейския съюз (ЕС) „Молекулярни и клетъчни основи на соматичния ембриогенез при люцерна” (INCO-COPERNICUS - IC15-CT96-0906). На базата на постигнатите научни резултати и доброто взаимодействие с един от партньорите групата по „Функционална генетика на бобови” от АБИ е поканена за партньор в проект по Шеста рамкова програма на ЕС „Зърнено-бобови” (FOOD-CT-2004-506223). Едно от основните достижения от работата на АБИ в Работен пакет (РП) 5.2 “*Tnt1* инсерционен мутагенез”, е създаването на колекция от *Tnt1* инсерционни мутанти на *M. truncatula*. На основата на създадената мутантна колекция от *M.truncatula*, екипът от група Функционална генетика Бобови, АБИ стана координатор на проект “Интегрирана функционална и сравнителна геномика на моделните бобови растения *M. truncatula* и *L.japonicus*”, финансиран от фонд “Научни изследвания” МОН в конкурс “Идеи”, обявен през 2008 г. В рамките на този проект стартираха изследвания по функционална геномика на бобови в България чрез прилагане на методите на права и обратна генетика. Ключови гени отговорни за растителното развитие и процеса на азотфиксация са клонирани и прехвърлени в генома на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*, с цел проучване на функцията и взаимодействието им с други гени.

Дългогодишния опит при работа с моделното растение *M. truncatula*, както и получените резултати са база за изграждане на платформа по функционална и сравнителна геномика при Бобови и създават предпоставка за интегриране на българските геномни изследвания с други европейски и световни програми в тази област.

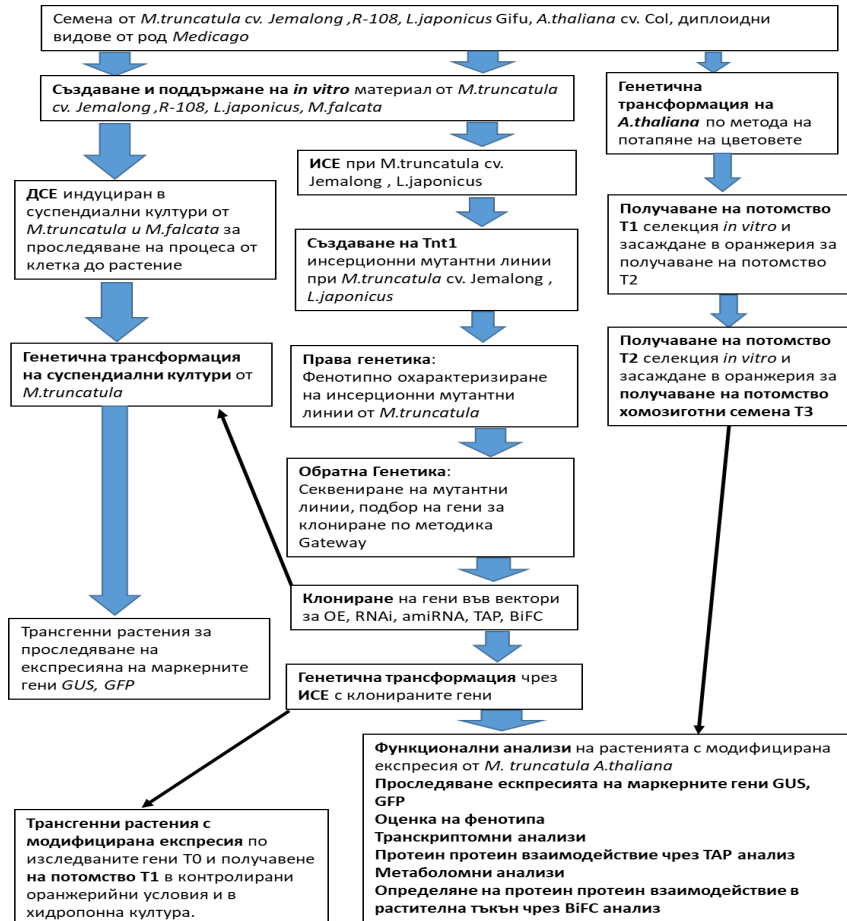
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да утвърди ролята на моделните бобови растения *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и моделното растение *Arabidopsis thaliana* в съвременните изследвания по растителни биотехнологии, сравнителна и функционална геномика и значимостта им при разбиране на растителната биология на бобови.

За постигането на тази цел са поставени следните основни задачи:

1. Доказване на асиметрията на първото клетъчно делене стартиращо процеса на директен соматичен ембриогенез в течна среда и проследяване на процеса от клетка до растение.
2. Изследване на размера на генома при диплоидни видове от род *Medicago* и връзката между размера на генома и компетентността за индуциране на директен соматичен ембриогенез в течна среда.
3. Получаване на стабилни трансгенни растения чрез трансформация на клетъчна суспендиална култура и индиректен соматичен ембриогенез от *M.truncatula*.
4. Разработване на регенерационни протоколи за ефективен инсерционен мутагенез чрез *Tnt1* ретроинсерционен мутагенез и създаване на колекция от мутантни линии при *M.truncatula* cv. Jemalong.
5. Разработване на системата за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно растение *Lotus japonicus*.
6. Идентифициране на *MERE1* ретроелемент и доказване на транспозицията му по време на *in vitro* регенерация на *M.truncatula*.
7. Фенотипиране на подобрени *Tnt1* инсерционни мутантни линии от създадената колекция в различни условия на отглеждане -*in vitro*, *in vivo*, аеропонна и хидропонна култура.
8. Конструирани на вектори за свръхекспресия, потискане на експресията /чрез методи RNAi и amiRNA/ и анализ на промоторната активност на изследваните гени, както и конструкти за TAP (Тандемно-Афинитетно пречистване) и BiFC (Бимолекулно флуоресцентно комплементиране) анализи.
9. Анализ на промоторната активност на изследваните гени в процеса на индиректен соматичен ембриогенез при *M. truncatula*.
10. Извършване на анализи по сравнителна геномика за проучване на функцията на ген кодиращ F-box белтък при моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana*.
- 10.1. Определяне нивото на генната експресия на *MtF-box* и *AtF-box* чрез количествен PCR в реално време (*qRT-PCR*) в потомството на трансгенни растения с модифицирана експресия и контроли и анализ на промоторната активност в растителни тъкани и органи на трансгенни растения от *M. truncatula* и *A. thaliana*.
- 10.2. Морфологични анализи и фенотипиране на T₁ трансгенни растения от *M. truncatula* и T₃ хомозиготни трансгенни растения от *A. thaliana*.
- 10.3. Определяне на максималната активност на *MtF-box* и *AtF-box* гена по време на клетъчния цикъл.
- 10.4. Определяне нивото на генна експресия на директен интерактор на *MtF-box* и *AtF-box* гена в трансгенни растения с модифицирана експресия и контроли идентифициран след TAP анализ.
- 10.5. Валидиране на резултатите от TAP анализа при *M.truncatula* трансгенни растения с модифицирана експресия на *MtF-box* и контрола чрез количествено определяне на свободни разклонени аминокиселини.
- 10.6. Валидиране на резултатите от TAP анализа при *A.thaliana* чрез провеждане на експеримент по Бимолекулно флуоресцентно комплементиране.

СХЕМАТИЧНО ПРЕДСТАВЯНЕ НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ



РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

I. Соматичен ембриогенез. ДСЕ в течна хранителна среда

Разработените оригинални експериментални системи за ДСЕ и ИСЕ при моделните растения представени в настоящия дисертационен труд са обобщени в глава от книга посветена на соматичният ембриогенез, първото издание на ръководство за моделното растение *M. truncatula*, и обзорно ревю (Iantcheva *et al.* 2006a; Iantcheva *et al.* 2008; Iantcheva and Revalska 2018). Натрупаните знания и опит за работа с моделното растение са предпоставка за успешно участие и ръководство на проекти от Шеста рамкова програма на ЕС (FOOD-CT-2004-506223 „Зърнено-Бобови“), и фонд НИ “Интегрирана

функционална и сравнителна геномика на моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*“-ДО-02-268, 2008г.

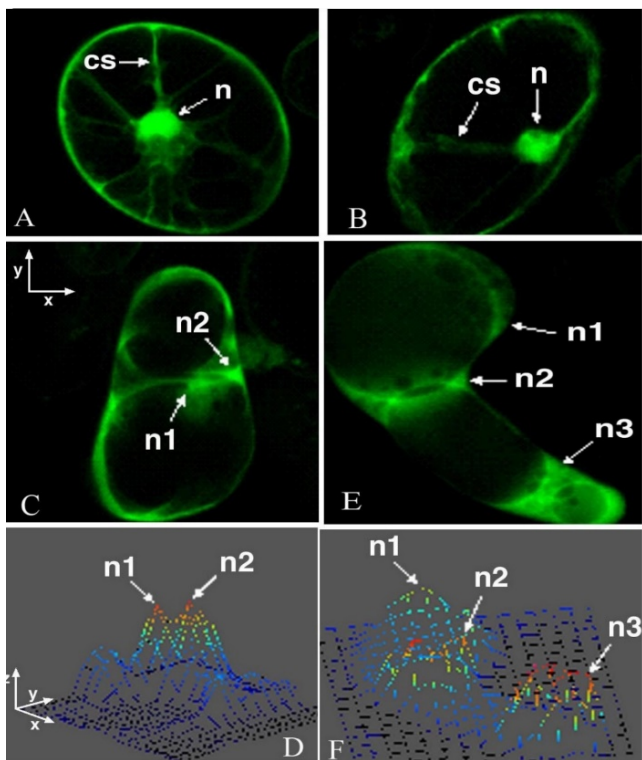
Резултатите от изследванията по соматичен ечбриогенез получени при изпълнението на гореспоменатите проекти хвърлят светлина върху процесите на регенериране на растения от единична клетка до цяло растение, способстват създаването на колекция от инсерционни мутанти от моделните растения, *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* и изследвания за установяване функцията на ключови гени участващи в растителното развитие.

При ДСЕ в течна среда соматичните ембриоиди се развират директно от епидермалните и суб-епидермалните слоеве на изходния експлант. Разработените протоколи при *M.truncatula* (Iantcheva et al. 2006a, Iantcheva et al. 2006b) позволяват индуцирането на соматични ембриоиди от различни растителни експланти – лист, листна дръжка, корен, единични клетки. Характерно за суспендиалните култури от *M.truncatula* е образуването на фина клетъчна фракция. 15 до 20 дни след индуцирането на соматичен ембриогенез единични клетки, клетъчни клъстери от 3-5 клетки, малки (до 20 клетки) и големи (повече от 20 клетки) и клетъчни агрегати се отделят от експлантите в културалната среда. Тези клетки се характеризират с различна форма сферични, елипсоидни или издължени с големина от 100-200 μ и притежават ембриогенен потенциал. Отделени в свежа индукционна среда отново формират ембриоиди и могат да продължат развитието си до цяло растение. При експериментални постановки базирани на клетъчни суспендиални култури от трансгенни растения от *M. falcata* експресиращи маркерния *GUS* ген под контрола на промотори на регулаторни гени от клетъчния цикъл и трансгенни растения от *M. truncatula* експресиращи маркерния ген за зелена флуоресценция *GFP* под контрола на конститутивен 35S промотор, е наблюдавана и доказана асиметрията на първото клетъчно делене стартиращо процеса за ДСЕ (Iantcheva et al. 2006a; Iantcheva et al. 2006b; Iantcheva and Revalska 2018).

1. Асиметрия на първото клетъчно делене при моделните системи *M. falcata* и *M. truncatula* в течна хранителна среда

Наблюденията с конфокален микроскоп върху клетъчна суспензия индуцирана от трансгенни растения *M.truncatula* експресиращи маркерния ген *GFP* показват, че клетъчната фракция е композирана от три типа клетки – сферични, елипсоидни и издължени Фиг. 1 А, В (Iantcheva et al. 2006a). Тези клетки притежават гъста цитоплазма и при прехвърлянето им на свежа индукционна среда съдържаща ауксин 2,4-D се реактивират към делене. Сигнала от зелената флуоресценция се наблюдава в клетъчното ядро, където бавно се акумулира, както и в цитоплазмените нишки. При клетките компетентни за делене ядрото е локализирано в периферията (Фиг.1В). При мезофилни протопласти от *M.sativa* Djjak и Simmonds (1988) също установяват локализиране на ядрото в периферията, непосредствено преди деленето. Проучванията направени в нашите изследвания потвърждават асиметричното разделяне на клетката на две неравни части (Фиг. 1 С). С помощта на суфтуера на конфокалния микроскоп е възможно да се определи силата на флуоресцентния сигнал в клетките и клетъчните структури. Пиковите, на зелена флуоресценция, които индикира програмата са два и са свързани с двете ядра на ново-разделената клетка на две неравни части. Последващите наблюдения индикират три пика на флуоресценция и образуването на три-клетъчно проембрио (Fig. 1D,E,F). развитието на клетъчните структури продължава с образуването на глобуларни и торпедни структури за период от 20-30 дни.

Фигура 1. ДСЕ от единични клетки при *Medicago truncatula*. А – сферична клетка с маркирано ядро и цитоплазмени нишки n- ядро; cs – цитоплазмени нишки; В-овална клетка с ядро позиционирано в периферията; С – асиметрично делене с две ядра n1, n2. D – ниво на флуоресценция след първото клетъчно делене, „fish-net“ изображение на интензитета на сигнала от С. Е-триклетъчно проембрио с ядра n1, n2, n3. F– „fish-net display“ изображение на интензитета на сигнала от “E”.



Генетичната трансформация при *M. falcata* 47/1/150 линия с висок регенерационен потенциал е бърза и ефективна с продуциране на трансгенни растения с рамките на два месеца. По 60 независими трансгенни растения са регенерирани от двата използвани конструкта *pAtcyc3a::GUS*, *pAtcdc2a::GUS*/ всички те са проверени чрез хистохимичен анализ за доказване на глюкоронидазна активност, а по 10 случайно избрани растения са проверени за наличие на селективния ген кодиращ неомидин фосфотрансфераза (Iantcheva *et al.* 2006a). Трансгенните растения, както и изходната линия са стерилни и се поддържат само в *in vitro* култура.

Доказаните трансгенни растения експресиращи маркерния *GUS* ген под контрола на промотори на регулаторни гени от клетъчния цикъл (циклин тип A */cyc3A*), който се експресираща по време на S/M фазата, характерен за делящите се клетки и циклин зависима киназа тип 2A */cdc 2A*, ген експресиращ се по време на G1/M фазата и е характерен за делящите се клетки, както и тези компетентни за делене) са използвани за индуциране на суспендиална култура и продуциране на клетъчна фракция. Типа на първото инициращо клетъчно делене и придобиването на ембрионна компетентност могат да се свържат и визуализират с експресията на маркерния ген контролиран от посочените по-горе промотори. При *M.falcata* фина клетъчна фракция се формира 10-15 дни след индуцирането на

суспендиалната култура, малките листни експланти формират ембриониди по краищата си и повърхността си, отделяйки в културалната среда клетки компетентни за делене Фиг. 2 А.

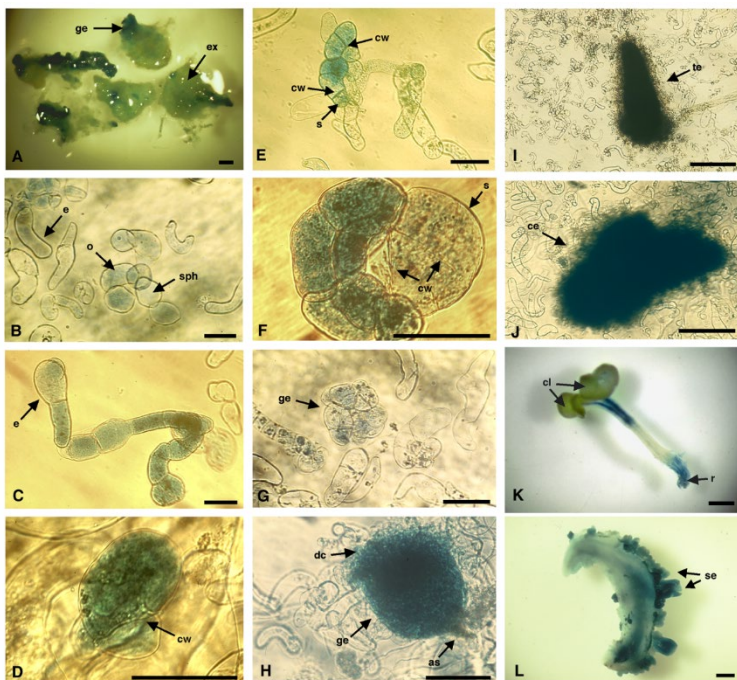
Клетките подобно на клетъчната фракция при *M.truncatula* са сходни по форма и размер – сферични, елипсоидни и издължени, притежават ембриогенен потенциал, могат да формират ембриониди, които да се развият до цяло растение. Най-често сферичните и елипсоидните клетки притежават пълтна цитоплазма и са по-малки по размер до 100 μ (Fig. 2 B,C). Този тип клетки предпочитано се делят асиметрично на две неравни части. В по-голяма част от наблюдаваните дялящи се клетки едната клетка от асиметричното делене формира суспензор обикновено състоящ се от 2-5 клетки Фиг. 2 D,E,F, а другата клетка формирана след асиметричното делене, продължава да се дели и формира соматичното ембрио Фиг. 2 F,G. Асиметрията на първото клетъчно делене и установяването на полярност са предпоставка за последващото развитие на соматичното ембрио. Подобни резултати са наблюдавани и при мезофилни протопласти от *M.varia* генотип А2 от (Dudits *et al.* 1995).

В по-късен етап на развитието при добре оформените ембриониди в стадий глобула суспензорът абортира, (Фиг. 2 H). Не е ясно точно каква роля играе суспензора в условията на течна хранителна среда, но най-вероятно е свързан с установяването на полярност при развиващите се ембриониди, или може би служи като канал за поемане на хранителни вещества и растежни регулатори от културалната среда, до обособяването на проводяща система в ембрионидите и в следствие абортира.

Проследявайки експресията на маркерния *GUS* ген под контрола на *suc* За промотор е документирано, че клетките на абортиралния суспензор в добре развит глобуларен ембрионид не се оцветяват в синьо Фиг.2 H, за разлика от клетките в про-глобуларен ембрионид, които са все още компетентни за делене Фиг. 2F. Следвайки процедурата за ДСЕ развитието от ден 20 до 40 продължава на среда съдържаща PEG без растежни регулатори. Забелязват се дялящи се клетки по повърхността на формираните ембриониди в стадий торпедо Фиг. 2 I, асиметричните деления намаляват от 3-4 пъти и се изравняват със симетричните. Развитието на структурите до котиледонен стадий Фиг.2 J, след 40^a ден продължава на течна среда MS₁ в присъствието на цитокинин в ниска концентрация и казеин хидролизат. Част от котиледонните ембриониди се превръщат в растения, а също така се наблюдава и процес на формиране на вторични ембриониди Фиг.2 K,L.

Разработените протоколи за клетъчни суспендиални култури при *M.falcata* и *M.truncatula* са от съществена значимост при изучаване на ранните събития – първо клетъчно делене, индуциране на ембриогенен потенциал при соматични ембриониди произхождащи от единични клетки. Тези системи са перфектен инструмент за проследяване на процеса на растително развитие от една клетка до цяло растение. Развитието на съвременната геномика и наличието на подобни системи за клетъчен соматичен ембриогенез позволява определянето на ключови гени и проследяване на експресията им в динамика през целия процес на растително развитие.

Не на последно място наличието на регенерация от клетъчни суспендиални култури предполага разработването на системи за генен пренос и произход на трансгенните растения от единични трансформирани клетки. Такава система за генен пренос е разработена и описана в следващия раздел на настоящата дисертация.



Фигура 2. Процес на формиране на соматично ембрио от единична клетка до растение при *Medicago falcata*. Експресията на маркерния ген *GUS* е визуализирана чрез синьо оцветяване. **A** – листен експлант от суспензията майка с глобуларни ембриоиди. (*рсус3а gus*); **ex** - екплант: **ge** – глобуларно ембрио, **bar** 1 mm; **B** – видове единични клетки наблюдавани в едноклетъчната фракция (*рсус3а gus* суспендиална култура), **o** -елипсоидна, **sph** -сверична, **e** - издължена, **bar** 100 μ m; **C** – неорганизирана структура от издължени клетки (*псdc2а gus*); **e** –издължена клетка, **bar** 100 μ m; **d** – асиметрично делене в елипсоидна клетка (*рсус3а gus*); **cw** –клетъчна стена, **bar** 100 μ m; **e** – триклетъчно про-ембрио (*рсус3а gus A*); **s** - суспензор, **bar** 100 μ m; **F,G** – проглобуларно и глобуларно ембрио (*рсус3а gus*), **bar** 100 μ m; **H** – добре оформено глобуларно ембрио (*сdc2а gus* суспендиална култура): **dc** – делящи се клетки по периферията притежаващи ембриогенен потенциал, **as** –абортрал суспензор, **bar** 200 μ m; **I** – соматично ембрио в стадий торпедо (*рсус3а gus*); **te** –торпедо, **bar** 1 mm; **J** – ембрио в котиледонен стадий (*сdc2а gus A*): **се** –котиледонен стадий, **bar** 1 mm; **K** –късен котиледонен стадий (*рсус3а gus A*): **cl** –котиледонни листа, **r** - корен, **bar** 1 mm; **L** – вторично ембрио образуване (*сdc2а gus A*): **се** –вторично ембрио, **bar** 1 mm.

2. Размер на генома при представители от род *Medicago*. Връзка между размера на генома и компетентността за индуциране на ДСЕ

В хода на изследователската работа е проучен размера на генома, на диплоидни видове от 17 популации с произход от Алжир включваща 8 едногодишни вида *M.orbicularis*, *M.arabica*, *M.laciniata*, *M.minima*, *M.ciliaris*, *M.truncatula*, едногодишен хибрид, *M.littoralis* x *M.truncatula*, *M.scutellata* и многогодишната *M.sativa* (Fyad-Lameche et al. 2016). Размера на генома е оценен чрез

флуориметрия по метод разработен от (Ochatt 2008), като допълнение на публикуваната в литературата процедура разработена първоначално от (Blondon *et al.* 1994). Хромозомният брой на тази разнородна популация от диплоидни видове също е анализиран. Размера на генома варира от $2C = 0.94$ pg при *Medicago orbicularis* (L.) Bartal., най-малкият след изследваните до $2C = 1.80$ pg при *Medicago laciniata* (L.) Miller. Данните за проучена колекция с произход от Алжир са представени в Таб.1. Изследвана е връзката между размера на генома и способността за индуциране на ДСЕ и ембриогенен отговор при четири от посочените видове принадлежащи към различни популации *M. orbicularis* DZ19C, ($2C = 0.94$ pg), *M. truncatula* Gaertn., DZ2B ($2C = 1.08$ pg), *M. scutellata* (L.) Miller 274, ($2C = 1.11$ pg); и *M. arabica* (L.) Huds., INA46, ($2C = 1.22$ pg). Установено е, че *Medicago orbicularis*, притежаващ най-малък геном, формира соматични ембриониди за най-кратък период, отличава се с най-висок процент на реагирани експланти и брой соматични ембриониди за експлант. Последван е от *M. truncatula*, *M. scutellata* и *M. arabica*, фактически по ред на нарастване на размера на генома Таб.2.

Представителите на род *Medicago* от изследваната Алжирска колекция се характеризират с две пloidни нива – диплоиди и тетраплоиди. Голяма част от изследваните видове са диплоидни $2n=14$ или $2n=16$ и основно хромозомно число $x=7$ и 8. Един от изследваните видове е тетраплоид, *M. scutellata* $2n=30$ (Таб. 1).

Размера на генома на едногодишните видове от тази колекция (Таб. 2) варира от $2C = 0.94$ pg (*M. orbicularis* популация DZ19C), до 1.11 pg (характерен за *M. truncatula*, новоопределен за *M. polymorpha* и *M. scutellata*), до 1.80 pg (*M. laciniata*). По време на проведените анализи са използвани референтни клонове, които се тестват регулярно и са с установена постоянна стойност: *M. truncatula* cv. Jemalong ($2C = 1.14$ pg), екотип R108-1 ($2C = 0.98$ pg); и тетраплоидната *M. sativa* “A2” ($2C = 3.44$ pg).

Компетентността за директно формиране на соматични ембриониди в течна хранителна B_5 среда е изследвана за 4 видове *M. orbicularis*, *M. truncatula*, *M. scutellata* и *M. arabica* (Fyad-Lameche *et al.* 2016). След 10-15 дни от индуцирането на суспендиална култура са формирани глобуларни ембриониди по експлантите или отделени в течната среда. Процента на реагирани експланти (листа, листни дръжки и корени) варира при изследваните видове (Таб. 2). При *M. orbicularis*, листата и листните дръжки, както и по-голяма част от кореновите експланти образуват соматични ембриониди; експлантите на *M. truncatula* се характеризират с по-слаб ембриогенен отговор, следвани от експлантите на *M. scutellata* и с най-ниска честота при *M. arabica*, където само една трета от експлантите реагират. Броят на образувани соматични ембриониди за експлант е в същия ред (Таб. 2). Периодът за индукция е най-кратък при *M. orbicularis* (листа и листни дръжки), 6-8 дни; до десетия ден, и при листата и листните дръжки се наблюдават значителен брой соматични ембриониди, както свързани с експлантите, така и отделени в течната хранителна среда. Кореновата тъкан се отличава с по-слаб ембриогенен отговор. Подобни са резултатите при *M. truncatula*.

Определеният хромозомен брой (Таб. 1) е в съгласие с предишни данни публикувани от Lesins and Lesins (1979). Изследваните популации от едногодишни диплоидни видове притежават хаплоиден брой хромозоми $x=8$. При предишни проучвания на (Lesins and Lesins 1979) *M. polymorpha* е определена с диплоиден брой хромозоми $2n = 14$ (и два сателита), а хромозомният брой за *M. scutellata* $2n = 30$ е установен в изследването на Vauchan и Elgin (Vauchan and Elgin 1984).

В направените от нас изследвания е определен размера на генома в 17 популации с произход от Алжир на осем едногодишни *Medicago* видове, и един хибрид, като референтни са използвани 5 вида от род *Medicago* (Таб. 2). Получените резултати са много близки до тези на Blondon *et al.* (1994): *M. orbicularis* с произход от Алжир притежава $2C = 0.94-0.96$ pg (срещу 0.99 pg определен от Blondon *et al.* 1994); *M. arabica* - 1.22 pg (срещу 1.16 pg). В някои случаи се наблюдават значителни различия, например за Алжирската *M. minima* е определен $2C=1.10-1.15$ pg (срещу 1.73 pg) преизчислен от Essad in Blondon *et al.* (1994) и Алжирският *M. ciliaris* с 1.56 pg (срещу 1.62-2.06 pg определен от Blondon *et al.* 1994).

В литературата не открихме предишни данни за размера на генома при *M. laciniata*, *M. polymorpha* и *M. scutellata*. Наблюдаваното значително вътревидово вариране в размера на генома при *M. truncatula*, където Jemalong е 16% по-голям R108-1, е идентично с това докладвано от Blondon *et al.* (1994). Алжирските популации при *M. truncatula* са доста хомогенни (еднакви букви Таб. 2) и са със значително по-голям геном с ~10%, от този при R108-1 екотип. В направеното проучване Алжирският едногодишен диплоид, *M. orbicularis* (2C = 0.95 pg) притежава най-малък размер на генома. Филогенетичните анализи направени от Steele *et al.* (2010), базирани на данни от секвениране на нуклеотидни последователности от пластидна ДНК кодираща *trnK/matK* ген (хлоропластен ДНК комплекс от *mutaraseK* ген локализиран в *trnK* интрон) и ядрена ДНК кодираща (гиберилин 3- β -хидролаза), *M. orbicularis* не е част от нито една охарактеризирана група и е определен като “вид сираче”. Следва групата от представители с размер на генома от 1.08-1.15 pg включваща *M. minima*, *M. polymorpha*, *M. scutellata* и *M. truncatula*. Спонтанният хибрид (*littoralis* \times *truncatula*) също попада в тази група, въпреки, че *M. littoralis*, като предполагаем родител, е докладван с много по-голям геном (2C = 1.34 pg от Blondon *et al.* 1994). Тези четири вида от различни под-секции на секция *Spirocarpos* имат почти еднаква 2C стойност. Независимо, че е тетраплоидна *M. scutellata* притежава неочаквано ниска стойност на размера на генома 2C = 1.11 pg. Този резултат контрастира с тези получени при други родове, където стойността на 2C се увеличава с пloidното ниво (Kharrat-Souissi *et al.* 2013). Хромозомният брой при *Medicago polymorpha*, 2n = 14, се характеризира с намаляваща пloidност, която най-вероятно се дължи на Робертсониева транслокация (Singh 2010; Steele *et al.* 2010). *M. scutellata* е позната като тетраплоид 2n = 30 (Bauchan and Elgin 1984; Hanson *et al.* 1988) произлизаща от хибридизация между видове с 2n = 14 и 2n = 16 (Lesins and Lesins 1979; Bauchan and Elgin 1984). На базата на секвенции на ниско повторените NORX гени Eriksson and Pfeil (2012) определят група формирана от *M. polymorpha*, *M. lesinsii* и *M. murex*, като сестринска група на *M. soleirolii*, *M. doliata* и *M. scutellata* и обикновено се групират с *M. truncatula* в други изследователски работи. Следователно тази група от едногодишни диви люцерни с размер на генома около 1.12 pg, съдържа видове с хромозомен брой 2n = 14, 16, както и нетипичната *M. scutellata* (2n = 30). *Medicago arabica* се характеризира със сравнително голям геном, 2C = 1.22 pg, следван от *M. ciliaris* с 1.56 pg и *M. laciniata* с 1.80 pg. *Medicago arabica* и *M. orbicularis* са определени като сестрински видове в изследване базирано на данни от EST секвениране (Steele *et al.* 2010), въпреки че стойностите на размера на генома при тези два вида са доста различни. Размера на генома се различава значително при някои видове, като например 59 % увеличение между *M. polymorpha* (2n = 14) и *M. laciniata* (2n = 16), въпреки, че те принадлежат на една и съща под-секция *Leptospireae*. При определяне на хромозомният брой *M. laciniata* е диплоид (2n = 16) със значителен размер на генома два пъти по-голям от генома на *M. orbicularis*. Откритите значителни разлики в размера на генома на различни диплоидни видове ни провокираха към проучване на връзката на размера на генома и компетентността към директно индуциране на соматични ембриони и ембриогенен потенциал в течна среда. Прилагайки протокола на (Iantcheva *et al.* 2006b) към избраните от нас 4 вида наблюдавахме обратна зависимост между размера на генома и индуцирането на ембриогенен потенциал. *Medicago orbicularis* (2C = 0.94) реагира за най-кратък период и с формиране на най-голям брой соматични ембриони следван от *M. truncatula* (2C = 1.08 pg), *M. scutellata* (2C = 1.11 pg) и *M. arabica* (2C = 1.22 pg). Най-често размера на генома е параметър за проверка на однородността на растенията продуцирани чрез *in vitro* култивиране, и спомага да се изолират полиплоидните и анеуплоидните регенеранти. Проверката на размера на генома също спомага да се идентифицира и отдели растителна тъкан съставена от клетки с различни нива на пloidност, която е неподходяща за клетъчно тъканини манипулации и предразполага към продуцирането на регенеранти с повишена пloidност (Catrice *et al.* 2006; Ochatt 2008). Анализ на размера на генома следва да се прилага и при таксономични изследвания при различни популации. Проучвани популации от *Cenchrus ciliaris* в Тунис се отличават по ниво на пloidност (Kharrat-Souissi *et al.* 2013).

Таблица 1. Размер на генома и хромозомен брой наблюдавани в представители на род *Medicago* с произход от Алжир.

Вид	популация	Брой хромозоми 2n	Размер на генома 2C (pg)	SD (pg)	Групи P<0.05 ^a	Брой повторения
Section <i>Orbiculares</i>						
<i>M. orbicularis</i>	DZ14A	16	0.960		-	
“	DZ19C	16	0.943	0.018	a	8
Section <i>Spirocarpos</i>						
<i>M. arabica</i>	46	16	1.220		-	
<i>M. laciniata</i>	239	16	1.800	0.007		4
<i>M. minima</i>	216	16	1.099	0.005	bdefghi	6
“	230		1.149	0.011	dghi	6
<i>M. polymorpha</i>	16	14	1.111	0.028	cdefghi	14
“	511	14	1.114	0.010	defghi	12
“	DZ15A	14	1.125	0.011	cdefghi	8
“	DZ20D	14	1.109	0.006	bdefghi	14
“	Serena	14	1.173	0.011		2

<i>M. scutellata</i>	274	30	1.110		-	

<i>M. ciliaris</i>	DZ13C	16	1.562	0.012		8

<i>M. truncatula</i>	28	16	1.120	0.009	cefghi	10
“	448	16	1.115	0.006	bdefghi	8
“	DZ2B	16	1.079	0.009	be	10
“	DZ15B	16	1.099	0.043	bcefgi	23
“	Jemalong(Gif)	16	1.137	0.022	cdefghi	6
“	Jemalong(ITG C)	16	1.136	0.010	cdefghi	12
“	R108-1	16	0.976	0.003	-	3

Section <i>Medicago</i>						
<i>M. sativa</i>	A2	32	3.444	0.026	k	12
<i>M. sativa</i>	Sitel	32	3.429	0.028	k	6
Hybrid of annuals						
<i>littoralis</i> × <i>truncatula</i>	DZA3175-2	?	1.122	0.002	cdefghi	2

Субсекциите на *Spirocarpos* са отделени с прекъснати линии

a. всяка хомогенна група носи еднакви букви (при P<0.05). Размера на генома може също да се изрази като базови двойки използвайки превръщането 1 pg DNA ≈ 978 Mbp.

Таблица 2. Потенциал за формиране на соматични ембриони при 4 едногодишни люцерни подредени по възходящ размер на генома .

a, Средно \pm sd от три независими експеримента, средно от 10-20 експланта при всеки експеримент.

Вид	Период за индукция (дни)	Честота на реагираниекспланти (%)			^a Брой ембриони /експлант		
		лист	л.др.	корен	лист	л.др.	корен
<i>M. orbicularis</i> DZ19C	8	95 \pm 1	95 \pm 1	70 \pm 1	15 \pm 1	10 \pm 1	4 \pm 1
<i>M. truncatula</i> DZ2B	10	90 \pm 1	80 \pm 1	70 \pm 1	10 \pm 2	9 \pm 1	7.5 \pm 1
<i>M. scutellata</i> 274	10-15	70 \pm 2	70 \pm 2	60 \pm 2	6.5 \pm 2	5 \pm 1	3 \pm 2
<i>M. arabica</i> INA46	10-15	40 \pm 1	20 \pm 1	50 \pm 1	5 \pm 1	4 \pm 1	6.5 \pm 1

II. Генетична трансформация

Разработването на ефективен протокол за растителна регенерация е основно изискване при създаването на трансгенни растения. Наличието на ефективен система за генетична трансформация способствана от *Agrobacterium tumefaciens* е предизвикателство за растителните биолози изследващи биологията на бобовите растения.

Генетична трансформация на клетъчна суспендиална култура

Разработената система за генетична трансформация на клетъчна суспендиална култура (Iantcheva *et al.* 2014; Iantcheva and Revalska 2019) позволява създаването на стабилни трансгенни растения регенерирани от единични клетки или малки клетъчни клъстери, е нова стратегия за създаване на трансгенни растения с модифицирана генна експресия и растения за проучване на промоторната активност. Произхода на трансгенни растения от единични клетки елиминира създаването на химерни трансгенни растения. Трансформираната суспендиална култура предлага неограничени възможности за изучаване на механизмите на процеса на соматичен ембриогенез и функционални анализи базирани на съвременните методи на системната биология за проучване функцията на изследваните гени, както и взаимодействията на протеини кодирани от тези гени.

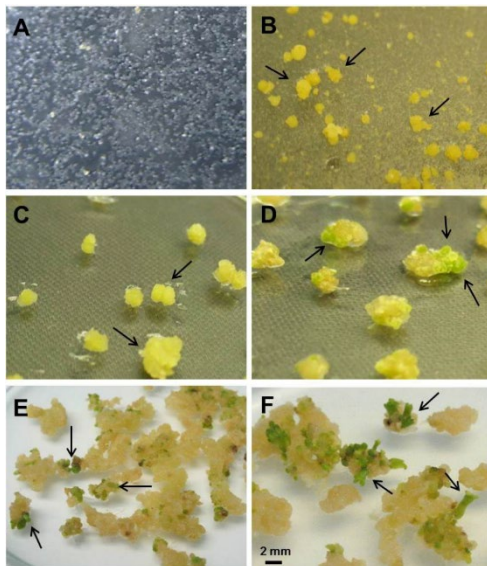
Четири милилитра опреснена фина клетъчна фракция третирана за 24 ч с ацетосирингон се ко-култивира с 400 μ l бактериална суспензия (*pM1ARF-B3:GUS/GFP* или 35S:СусF-GFP) на клатачен апарат. След ко-култивирането клетките и клъстерите от суспендиалната култура заедно с бактерията образуват обща плътна клетъчна маса. Тази плътна маса се прехвърля на твърда среда CIM за още 48 ч ко-култивиране, след което започва период на индуциране на калусни структури във формата на малки топчета на селективна CIM среда (Фиг.3,А). В хода на експерименталната работа са изпитани две концентрации на ацетосирингон за подобряване на ефективността на трансформацията. Установено е, че концентрация от 25 μ M има положителен ефект върху трансформационната честота, отчетена при формираните калусни топчета експресиращи маркерния ген за зелена флуоресценция. Стъпките на процеса на регенерация на трансформираната суспендиална култура са представени на (Фиг.3).

За период от 15-20 дни се наблюдават калусни структури приличащи на топки (Фиг.3. В). Калусните структури с големина (1-2 mm), които нарастват се прехвърлят на свежа селективна среда (Фиг.3 С). По време на вторият пасаж на селективна среда се прави втори скрининг на калусните топчета (1-4 mm) за наличие на зелена флуоресценция. Структурите с наличие на отчетлив *gfp* сигнал се

прехвърлят на среди за ембрио индукция и развитие. За период от две седмици на среда за ембрио индукция по повърхността на калусните топчета се забелязва образуването на зелени зони и последващо развитие на ембриоиди (Фиг.3. D, E). Присъствието на ауксин NAA и цитокин BAP в съотношение 1:3 в средата за индуциране на соматични ембриоиди повлиява положително този процес. Последващото развитие на соматичните ембриоиди продължава в присъствието на ниска концентрация цитокинин BAP и казеин хидролизат, които стимулират ембрио-издължаването и развитието на добре оформени би-полярни структури (Фиг.3 F). Трансгенната природа на формираните ембрио структури в глобуларен, торпеден и котиледонен стадий се потвърждава чрез хистохимичен анализ за наличие на GUS активност. Промоторната активност *MtpARF-B3* е визуализирана чрез хистохимичен анализ на ембриоиди в различен стадий (Фиг. 4 A, B), а присъствието на сигнал за зелена флуоресценция също е потвърдено в ядрата на епидермални клетки на ембриоиди в късен торпеден стадий (Фиг. 4 C). Ембрионите в котиледонен стадий с добре изразена би-полярна структура продължават превръщането си до растения на селективна основна среда. В някои случаи се оформят клъстери от ембриоиди, които се разделят внимателно, за да се подпомогне процеса на формиране на корени. Периода за превръщането на соматичните ембриоиди в растенията е от 20-40 дни.

Фигура 3. Стъпки от процеса на трансформация на клетъчна суспендиална култура от *M.truncatula*:A- Клетъчна суспензия платирана след ко-култивиране. B-първи пасаж на калусни структури на селективна СИМ среда.C- калусни структури готови за скрининг за наличие на GFP сигнал.D- формиране на ембриогенни зони на ЕИМ среда. E, F Ембрио развитие и удължаване. Scale bar 2 mm.

Вкоренените на селективна среда растения се подлагат на PCR анализ за доказване присъствието на селективен ген (Фиг.4 D). Растенията показали положителен сигнал се прехвърлят в оранжерия за

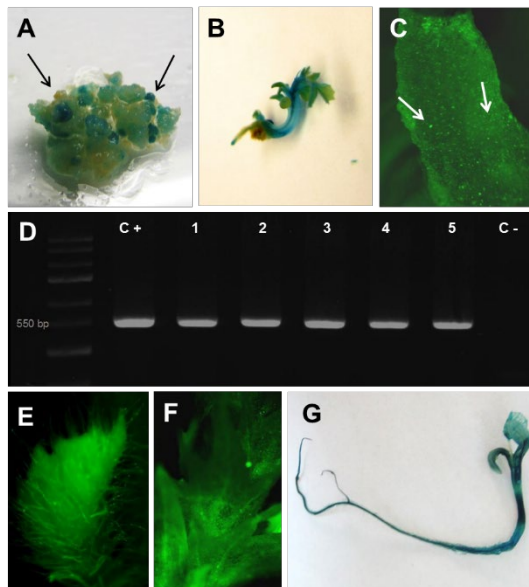


получаване на потомство. Регенерираните растения чрез трансформация на клетъчна суспендиална култура притежават морфология, време на цъфтеж и образуване на семенни кутийки като контролните растения. Ефективността на разработената система за генен пренос е отчетена в потомството при наличие на селективен ген в генома, както и положителен сигнал за β -глюкоронидазна активност или

наличие на сигнал за зелена флуоресценция (Фиг.4. Е, F, G). Събраните T₁ семена на трансгенните растения са отгледани на селективна среда, за да се проследи разпадането в потомството. Пултът от тествани семена се характеризира с Менделово разпадане 3:1.

Разработената система за генетична трансформация на клетъчни суспендиални култури от *M. truncatula* притежава редица предимства, но едно от най-важните е, че се регенерират стабилни и фертилни трансгенни растения от единични клетки. Трансформираните суспендиалните клетъчни култури подпомагат изучаването на различни физиологични, биохимични процеси, които протичат на клетъчно и суб-клетъчно ниво. Те представляват мощен инструмент за функционални анализи и анализ на промоторната активност на изследвани гени и взаимодействия на ниво протеин. Протоколът за трансформация на суспендиални клетъчни култури предоставя възможност за охарактеризиране на специфични гени функции и ключови етапи от развитието на бобовите растения.

Фигура 4. А, В. Експресия на маркерен *GUS* ген под контрола на *MtARF-B3* промотор в глобуларни и котиледонни ембриони. С - Експресия на GFP маркерния ген в торпедо ембрио. D - PCR анализ за присъствието на селективен ген *nptII* в T₀ растения след трансформация с *Mt35S::Cys-F-box-GFP* конструктор. Е, F - Лист и прилистници от T₁ GFP положителни растения. G - *GUS* под контрола на *MtARF-B3* положителни T₁ семена.



Генетична трансформация чрез индиректен соматичен ембриогенез

Генерирането на стабилни трансгенни растения чрез процес на индиректен соматичен ембриогенез е най-застъпено сред изследователите на бобови растения. Въпреки дългия и трудоемък период за получаване на трансгенните растения, този метод е най-използван от растителните биолози. Конструирването на по-голяма част от стабилните трансгенни растения с модифицирана експресия на изследваните гени, както и тези за визуализиране на промоторната активност, чрез процеса на ИСЕ в проучванията на групата по Функционална Генетика бобови е документирано в публикуваните ни

изследвания (Revalska *et al.* 2015; Iantcheva *et al.* 2015; Boycheva *et al.* 2015; Revalska *et al.* 2016a; Boycheva *et al.* 2017; Revalska *et al.* 2017; Revalska and Iantcheva 2018a; Revalska and Iantcheva 2018b). ИСЕ се характеризира с фаза на образуване на калусна тъкан и последващо индуциране на соматични ембриони, които преминават през фази на развитие и превръщане до растения. Продължителната експериментална работа с представители на род *Medicago* ни позволи да определим оптимални параметри за ефективно генериране на стабилни трансгенни растения. Най-често използваните растителни експланти са листа и листни дръжки от *in vitro* растителен материал на възраст 30-35 дни. За постигане на по-добра ефективност при процеса на генен пренос стартиращите експланти обикновено се пре-третират /за период от 2-4 дни/ на средата за индуциране на калусна тъкан съдържаща ауксин 2,4-D в сравнително високи концентрации от 4 до 5 mg/l, което провокира клетките на експланта към ре-активиране на клетъчно делене. Оптималната плътност на бактериалната суспензия варира от OD=0.5-0.7, като желаната плътност се постига с разреждане чрез използване на специфичната за поддържането на *Agrobacterium* среда YEB. Това създава благоприятни условия за прикрепване на бактерията към растителната тъкан и последващото и инфектиране. В хода на експерименталната работа установихме, че инокулиране на пре-третираните експланти с бактериална суспензия за 1 час на хоризонтален шейкър при ниски обороти 40 rpm позволява всеки експлант да бъде в непосредствено съприкосновение с бактерията. Трансформираният растителен материал се култивира за период от 48 часа на тъмно на средата използвана за пре-третиране.

Прилагането на селекция веднага след периода на ко-култивиране, както и прекъсването и за период от един пасаж на средата за индуциране на соматични ембриони повлиява положително регенерацията на трансформираната тъкан и едновременно с това намалява до минимум броя на регенериране на не-трансгенни растения. Установената оптимална доза на селективен агент най-често антибиотик канамицин е 50 mg/l Км. Избора на антибиотик за елиминиране на бактериалната инфекция също е от значение в процеса на регенериране на трансгенни растения. В нашите експерименти използваният антибиотик е карбеницилин (Cb) (Carbencillin disodium, Duchefa), който е по-ефективен от други подобни, като Claforan (Cefotaxime), Augmentin. Използван е в концентрация 400 mg/l с последващо намаляване до 200 mg/l по време на ембрио индукцията и развитието, което не повлиява отрицателно процеса на регенерация и елиминира успешно бактериалната инфекция. Средата за индуциране на соматични ембриони се характеризира с присъствието на ауксин нафтил оцетна киселина NAA и цитокинин бензиламинопурин, което повлиява положително процеса на оформяне на зелени ембриогенни зони и последващо индуциране на соматични ембриони от тях.

В предишни наши изследвания по ДСЕ (Iantcheva *et al.* 2006b; Iantcheva *et al.* 2005) е установено положителното действие на цитокинин в ниска концентрация 0.05 mg/l BAP върху процеса на развитие на соматичните ембриони, допълнен от действието на казеин хидролизат 250 mg/l. Добавянето на свободни аминокиселини под формата на казеин хидролизат в процеса на ембрио развитие подпомага издължаването на ембрионите и оформянето на коренова и връхна част с последващо развитие на котиледонни листа. На този етап на развитие соматични ембриони с описаната морфология преминават към процес на превръщане до растение. Процеса на формиране на добре обособен корен и вкореняване на предполагаемото трансгенно растение на среда в присъствието на селективен агент се повлиява положително от намаляване наполовина концентрацията на макро елементи и захароза.

Пултът от получени трансгенни растения се подлага на масиран скрининг най-често за доказване на β -глюкоконидазна активност или наличие на сигнал за зелена флуоресценция. От показателите положителен сигнал растения на случаен принцип се отбират растения, които се подлагат на PCR анализ за присъствие на *nptII* гена за антибиотична устойчивост. Доказаните трансгенни растения се аклиматизират в адаптационно помещение в почва и се отглеждат за получаване на потомство. Така регенерираните T₀ трансгенни растения и тяхното потомство T₁; T₂ се използват в последващи морфологични, физиологични, молекулярни и функционални анализи.

III. Създаване на колекция от *Tnt1* инсерционни мутанти при *M.truncatula*

Първата стъпка за създаване на обширна колекция от инсерционни мутантни линии от *M.truncatula* св. Jemalong е наличие на доказателство, че ретротранспозона *Tnt1* се активира по време на *in vitro* регенерацията. Първоначално са създадени трансгенни линии носещи малък брой копия на *Tnt1*, така наречените „стартращи линии“ - А, В и С, съответно с 8, 4 и 2 *Tnt1* инсърта, които се характеризират с висок регенерационен потенциал. Първоначално стартращите линии са регенерирани при прилагане на протокол R1 (Chabaud *et al.* 1996). Прилагането на този протокол при линии А и В предизвиква транспозиция варираща в широки граници в регенерираните растения с до 10 нови инсърта или пък отсъствие на нови транспозиции. Тези резултати са напълно различни от получените за генотип R108, при който се наблюдава честота на новите включвания на *Tnt1* до 25 в регенерираните растения (d'Erfurth *et al.* 2003, Tadege *et al.* 2008). Подобна хетерогенна транспозиция, при която само 40 % от регенерираните растения се характеризират с нови инсърти на *Tnt1* е наблюдавана и при маруля (Mazier *et al.* 2007). Трябва да се отбележи, че изпитаните стартращи линии А и В при прилагане на протокол R1 не показват достоверна разлика свързана с честотата на транспозиция (Таб. 3). Нито едно от 14 тествани растения регенерирани от стартраща линия С /с 2 копия на *Tnt1*/ не показва наличие на нови транспозиции.

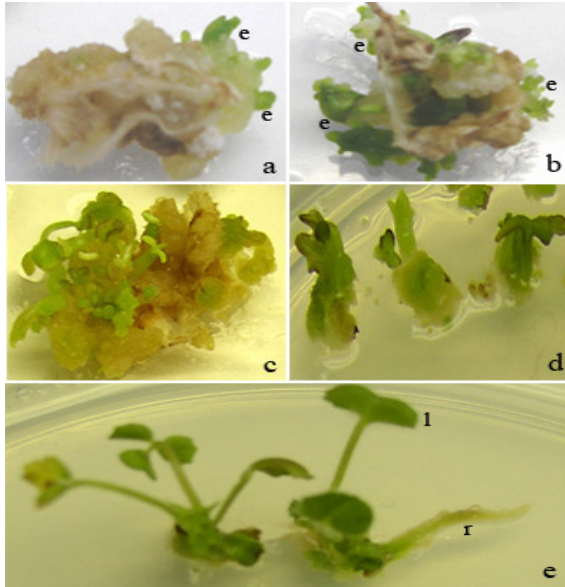
Таблица 3. Процент на растения с нови *Tnt1* инсърти при *in vitro* регенерация на стартращи линии А и В и използване на протоколи R1, R2, R3 и R5. Статистическите анализи направени чрез χ^2 , който показва значителна разлика $\chi^2 > 3.84$ (p value = 0.05). Няма достоверна разлика при двете стартращи линии при прилагането на един и същи протокол. Сравняването на протоколите е направено при обединяване на резултатите от двете стартращи линии /А, В/. Анализът показва, че протоколи R2, R3 и R5 не се отличават статистически по отношение на ефективността на *Tnt1* транспозиция (χ^2 не е посочена), но протокол R1 е статистически по-малко ефективен при сравнение с останалите при протокола. (χ^2 болдирани стойности)

Стартраща линия	Общ брой анализирани растения	Растения с нови <i>Tnt1</i> инсърти		Сравнение между стартращите линии χ^2 стойност	Сравнение между R1 и другите протоколи χ^2 стойност
		Брой раст.	%		
Протокол R1					
А	75	28	37	1.77	-
В	67	18	27		
Протокол R2					
А	21	13	62	-	4.04
Протокол R3					
А	28	22	77	0.52	24.96
В	16	11	68		
Протокол R5					
BCX-N	285	193	66	0.02	50.51

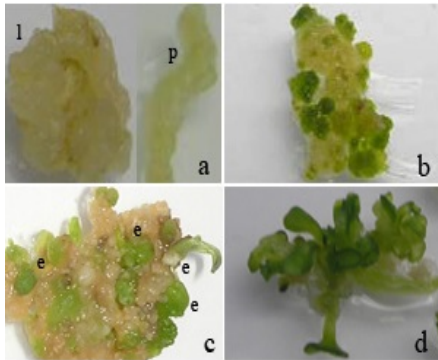
Незадоволителните резултати от честотата на транспозиция при използване на протокол R1 при генотип Jemalong наложи разработването и изпитването на нови протоколи R2 и R3 за ИСЕ (Iantcheva *et al.* 2008) с цел постигане на по-висока честота на транспозиция в процеса на *in vitro* регенерация. Протоколи R2 и R3 се характеризират с наличие на калусна тъкан и прилагане на ауксина 2,4-D в средата за индуциране в по-висока концентрация или различие в съотношението цитокинини:ауксини в сравнение с протокол R1. Ново разработеният протокол R2 е със сравнително къс период за регенерация с индуцирането на малко калусна тъкан, като хранителната среда за индуциране на калус

е на основата на MS макро, микро елементи и витамини. При новоразработения протокол R3 средата е композирана на основата на B5 соли и витамини, а концентрацията на 2,4-D е повишена до 4 mg/l в комбинация с цитокинин кинетин в концентрация 0.8 mg/l, което благоприятства формирането на калусна тъкан в голямо количество. При протокол R5 концентрацията на ауксина в средата за индуциране на калусна тъкан е 5 mg/l, но основния минерален състав и витамини са на основата на SH хранителна среда взаимствана от протокола за регенерация при генотип R 108 1. Променящата се концентрация на 2,4D в различните протоколи е проследена по отношение честотата на транспозиране на *Tnt1*. Протокол R2 се характеризира с бързо и ефективно формиране и развитие на соматичните ембриони и основните моменти при протичането на регенерацията по този протокол са представени на (Фиг. 5). Чрез този протокол са регенерирани около 200 мутантни линии, като 21 от тях са случайно подбрани и анализирани чрез метода на IP-PCR. 13 от растенията регенерирани чрез този протокол (62 %) притежават нови включения на *Tnt1* ретротранспозона (Таб. 3) средно с 6-7 нови копия на регенерирана линия.

Фигура 5. Регенерация чрез ИСЕ при прилагане на протокол R2. а- индуциране на малко калусна тъкан в присъствието 1 mg/l 2,4D от лист. б-формиране на соматични ембриони; с, d - развитие на соматични ембриони и формиране на на котиледонни листа; е-превръщане до растенище.



Около 400 растения са регенерирани по протокол R3, като основните стъпки в регенерацията са представени на (Фиг.6), при използването на стартиращи линии А и В. 44 от тези растения са случайно подбрани и анализирани чрез TD-PCR, като от тях 33 се характеризират с нови инсерционни събития (Таб. 3) със средно до 11 нови включения на ретротранспозона при всяко регенерирано растение (Фиг.7). Постигнатата ефективност на транспозиция е приблизително 75 %.



Фигура 6. Регенерация чрез ИСЕ при прилагане на протокол R3.

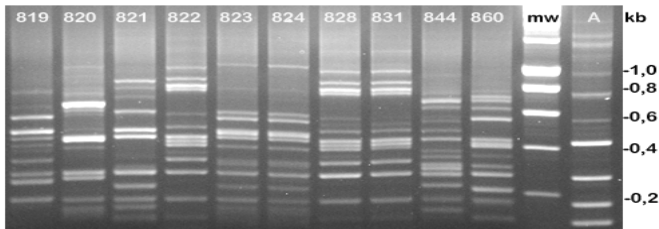
a- индуциране на калусна тъкан в присъствието 4 mg/l 2.4D от лист-1 и дистна дръжка-р.

b-формиране на ембриогенни зони;

c-образуване и развитие на соматични ембриоиди-е;

d-развитие на котиледонни листа.

Фигура 7. Транспозон дисплей анализ на мутантни линии регенерирани по протокол R3. A - стартираща линия; mw-маркер



Повече от 500 растения са регенерирани чрез използването на протокол R5, като от тях са анализирани 339. Около 67 % притежават поне по едно ново копие на *Tnt1* (Таб.3). Повечето от регенерираните растения се характеризират с 3-5 нови копия, но само няколко притежават повече от 10 нови копия, като за този протокол е отчетена средна честота от 3 до 4 нови включения *Tnt1* за регенерирано растение. При изпитаните протоколи не е отчетена разлика в честотата на транспозиция свързана със стартиращите линии (Таб. 3).

В проекта Зърнено-бобови, работен пакет 5.2 Групата по функционална Генетика бобови бе основен продуцент на мутантни инсерционни линии. По наша инициатива е разработен нов подход за увеличаване на транспозиционната честота. В хода на експерименталната работа е изпитано претретиране на експлантите с осмотичен шок (5M захароза) преди инициране на регенерация с цел повишаване честотата на транспозиция на *Tnt1* ретроелемента (Iantcheva et al. 2009a).

В предишни изследвания е доказано, че транскрипцията на ретроелемента *Tnt1* може да се индуцира чрез различни третириания с химични агенти или третириания чрез прилагане на абиотичен стрес (Mhigi et al. 1997, Vernhettes et al. 1997). За да установим дали такива третириания стимулират *Tnt1* транспозицията при *M.truncatula* cv. Jemalong по време на *in vitro* регенерацията изпитахме ефекта на

два вида химични агенти в стъпка от регенерационната процедура. Бе изпитано пре-третиране със салицилова киселина, както и прилагане на силен осмотичен шок (5M захароза) на изходната растителна тъкан. Установено е, че прилагането на салицилова киселина по време на индуциране на калусна тъкан при регенерационен протокол R1 няма ефект върху транспозицията на *Tnt1* при *M. truncatula* cv. Jemalong. За разлика от тези експерименти е наблюдавано значително повишаване на ефективността на *Tnt1* транспозиция чрез претретиране на изходната растителна тъкан чрез прилагането на осмотичен шок и последваща регенерация по протоколи R1, R2 и R3. Ефекта на осмотично претретиране върху *Tnt1* транспозицията е оценено чрез потапяне на изходните листни експлантите в разтвор на захароза преди прилагането на протоколи R1, R2 и R3. Установихме, че осмотичното претретиране води до скъсяване на фазата на индуциране на калусна тъкан, подобно на това описано от Iantcheva *et al.* (2005a), но също така се отразява негативно върху жизнеността на експлантите. Претретиране със захароза и прилагане на протокол R2 води до некротиране на експлантите и последващо формиране само на 3-5 ембрионида на експлант вместо 5-15 отчетени без претретиране. При протокол R3, листата и листните дръжки са способни да образуват мек калус, но броя на формираните ембриониди е редуциран до 5. Независимо от негативните ефекти, които има осмотичното претретиране върху експлантите и броя на формираните ембриониди приблизително 350 растения са регенерирани и случайно подобрани растения регенерирани от двете изходни стартиращи линии А и В са анализирани чрез TD-PCR. Резултатите показват, че независимо от регенерационния протокол, осмотичното претретиране повишава процента на регенеранти с нови инсърти на *Tnt1* (Таб. 4). Сред тестираните линии установихме от 6 до 11 нови копия на ретроинверсията за линия. От проведените експерименти при прилагането на различните протоколи можем да заключим, че осмотичното претретиране повишава ефективността на транспозиция при протокол R1 (Таб. 4) и R2 и значително повишава ефективността при протокол R3. Продължителността на осмотично претретиране е от (3-5h) при протоколи R2 и R3 в сравнение с протокол R1 (1h). При оптимална продължителност на претретиране (3-5h) и прилагането на протокол R2 и R3 за регенерация позволи процента на регенериране на линии с нови инсърти да се покачи до 95 % (Таб. 4).

Таблица. 4. Ефект на претретиране със захароза върху *Tnt1* транспозицията при регенерирани растения при използване на стартиращи линии А и В и протоколи R1, R2 и R3. Статистическите анализи са направени при използване на χ^2 тест, който показва значителна разлика $\chi^2 > 3.84$ (p value = 0.05). положителен ефект при претретиране със захароза върху броя на регенерирани растения с нови инсърти е статистически достоверно за протоколи R1 и R2 (χ^2 стойности в bold), но не и за протокол R3.

Претретиране условия-	Брой анализирани растения	Растения с нови <i>Tnt1</i> инсърти Брой растения %		Статистически ефект на пре третиране със захароза върху <i>Tnt1</i> транспозицията χ^2 стойност
Протокол R1/ стартираща линия В				
контрола	27	3	12	6.2
+ захароза	50	19	42	
Протокол R2/ стартираща линия А				
контрола	19		62	7.1
+ захароза	19	11	95	
Протокол R3/ стартираща линия В				
Контрола	16	11	68	3.5
+ захароза	17	16	94	

Процеса на създаване на колекция от мутантни линии при *M. truncatula* Jemalong спомогна за определяне на важни параметри свързани с ефективността на транспозиция на *Tnt1*. *In vitro* генерирането на колекция от инсерционни мутанти произлизащи от линии с малък брой копия на ретрогенетичния елемент води до различна ефективност на транспозицията на *Tnt1*. Прилагането на осмотичен шок спомага за увеличаване на процента на *Tnt1* транспозиция при 95% от регенерираните линии. Това претретиране увеличава не само броя на линии с нови инсерции, но и броя на нови инсерции за всяко отделно растение. Установяването на оптимални условия за транспозиция подпомага процеса на конструиране на колекция от инсерционни мутанти и насищане на генома с мутации при *M. truncatula* Jemalong. Разработените нови протоколи за регенерация при моделното растение са от полза на изследователите при бобови растения при създаването на трансгенни растения необходими за изследванията по функционална геномика.

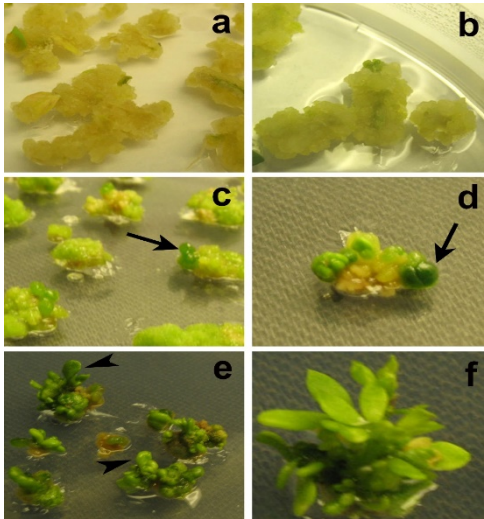
IV. Създаване на система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при *L. japonicus*

Една от основните задачи на проекта ИФКОСМО е разработване на система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно бобово растение *L. japonicus*. Наличието на алтернатива различна от ендоретротранспозона *LORE1* за създаване на мутантни линии при това моделно растение би подпомогнала изследванията по сравнителна геномика (Iantcheva *et al.* 2016). Основна стъпка при създаването на колекция от мутантни линии чрез ретрогенетичния елемент *Tnt1* е наличието на ефективна система за растителна регенерация/трансформация. От опита при създаване на колекция от инсерционни мутанти от *M. truncatula* установихме важната роля на стъпката на дедиференциация на клетките на растителната тъкан, чрез формиране на неорганизирана калусна маса, която способства ре-активирането на ретроелемента и пренасянето му на нови места в генома. За тази цел новосъздадената регенерационна /трансформационна процедура е разработена в присъствието на ауксин 2,4-D, който не е типичен растежен регулатор използван за регенерация при *L. japonicus*. Наличието на ауксин 2,4-D в средата за индуциране на калусна тъкан (СІМ) предизвиква дедиференциране на клетките на тъканта и формиране на мек и рехав калус (Фиг. 8 а,b). Използването на условия на светлина и тъмнина при индуциране на калусна тъкан от стартиращите експлантите и последващото му нарастване е еднакво ефективно и води до положителен отговор при 85 % от заложените експлантите. Наблюдава се различие при цвета на индуцираната тъкан (жълта в условията на култивиране на тъмно и светло-зелена при култивиране на светло), но е с еднакъв капацитет при процеса на ембрио формиране (Фиг. 8 а,b). Присъствието на цитокинин ВАР и ауксин NAA при процеса на формиране на ембриогенни зони (ЕІМ) води до появата на зелени точки, които впоследствие се развиват до глобуларни ембриониди (Фиг. 8 с) за период от 30-40 дни. Новоразработената среда за ембрио развитие (ЕD) в присъствието само на цитокинин ВАР прави възможно по нататъшното развитие на формираните глобули. Последващите 2 до 3 пасажа на тази среда довеждат до успешното формиране на котиледонни ембриониди при 50 % от индуцираните глобуларни ембриониди (Фиг. 8 d,e,f).

Генетична трансформация

Претретиране на експлантите на твърда СІМ за 48 h преди инокулиране с бактериална суспензия с оптична плътност $OD_{600} = 0.3$ за 1 h са установените оптимални условия за запазване жизнениостта на експлантите. Селективният натиск от 5.5 mg/l хигромицин (Hug) не премахва напълно образуването на калус при контролните експлантите, но спомага бързото образуване на калус при трансформираната тъкан. Наличието на селективен агент в първите две регенерационни стъпки – индуциране на калус и ембрио формиране спомага за отделянето на трансформираната тъкан, но премахването му по време на развитие на соматичните ембриониди подпомага успешното нарастване на структурите. Така установените оптимални параметри за генен пренос при *L. japonicus* водят до регенериране на 57 добре развити трансгенни растения. Направеният PCR анализ потвърждава включването на *hptIII* гена при 86 % от регенерираните трансгенни линии. Отчетените 14 % растения показващи негативен резултат са най-вероятно следствие от прекъснатата селекция по време на процеса на ембрио развитие.

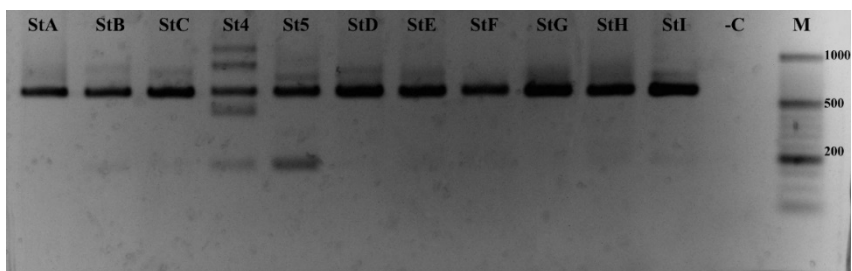
Фигура 8. Стъпки в процеса на регенерация на *L. japonicus* при използване на новосъздадения протокол за регенерация с инициране на калусна фаза. **a,b** мек и рехав калус индуциран на светло и тъмно; **c,d** ембриогенни зони на среда (ЕМ), които се развиват до глобуларни ембриони; **e** формиране на котиледонни ембриони; **f**-формиране на растеница.



Определяне на броя копия на *Tnt1* в стартиращите линии от *L. japonicus*

Броят *Tnt1* копия в получените 57 трансгенни растения, наречени 'стартиращи линии' (St), е анализиран чрез PCR метод. Този метод е ефективен при доказване на мутантни линии и използван при предишни наши изследвания (Iancheva *et al.* 2009a; Ratet *et al.* 2010; Revalska *et al.* 2011) и потвърждава бързото и прецизно доказване на броя *Tnt1* копия в охарактеризирането на стартиращи линии от *L. japonicus*, техните регенеранти и потомството им (Фиг. 9). При по-голяма част от изследваните трансгенни линии се наблюдава един бенд с големина от 600 bp (Фиг. 9). Този фрагмент кореспондира на фланкиращите последователности на *Tnt1* ретроелемента (*pCambia1381XC:Tnt1 T-DNA*), който е интегриран в генома на трансгенните растения и потвърждава тяхната трансгенна природа. Фрагменти с големина по-малка от 200 bp наблюдаван в пътеки 4 и 5 (стартиращи линии St4 и St5, Фиг. 9) и St6 и St8 (Фиг. 10) отговарят по големина на двата крайни повтора на ретроелемента и няколко базови двойки от генома и представляват свободни копия на елемента в трансгенните растения. Тези свободни копия показват експресията и обратната транскрипция на ретроелемента в тези линии. В стартираща линия St4, 3 до 4 допълнителни фрагмента са идентифицирани, които кореспондират на нови места на включвания на елемента и показват, че той е активен по време на процеса на трансформация/регенерация. Профила на St4 линията я прави добър кандидат, като стартираща линия при последващите експерименти на транспозиция.

Фигура 9. PCR анализ на *Tnt1* стартиращи линии (StA-I) с най-често наблюдаван инсерционен профил. Пътеки от 1 до 11, *Tnt1* положитилни линии; пътека 4 и 5, St линии 4 и 5 с 5 и 3 *Tnt1* копия; пътека 12 (-C), отрицателна контрола; пътека 13 (M), ДНК маркер.

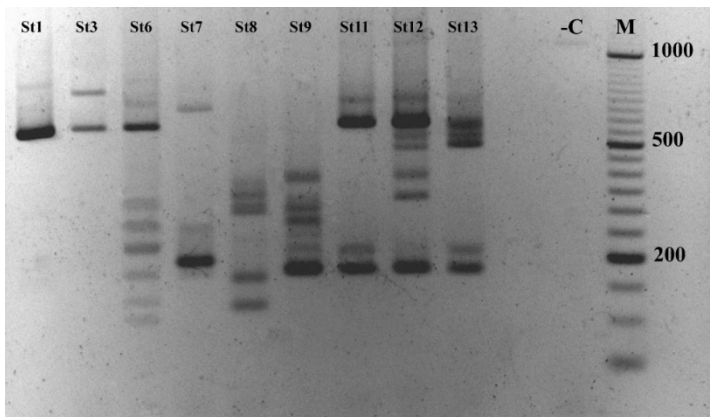


Резултатите отразени на Фиг.10 показват, че някои от създадените стартиращи линии (St7, St8 и St9) не включват в генома си 600 bp фрагмента, отговарящ на T-DNA от конструкта. Въпреки това тези линии са PCR положителни по отношение на фланкиращите *Tnt1* последователности. Тези резултати са потвърждение на получените от d'Erfurth *et al.* (2003) и показват, че *Tnt1* инсъртите в генома на *Lotus* са независими от T-DNA по време на процеса на трансформация/регенерация. Стартираща линия, St9 съдържа няколко фланкиращи последователности, които представляват няколко инсерционни места на *Tnt1* ретроелемента в генома на *Lotus*. Сред анализиранияте линии някои се характеризират само с T-DNA копие (St1) или T-DNA копие и допълнителни автономни копия стартиращи линии St3, St6, St11, St12 и St13, което е потвърждение за транспозиция в генома на *Lotus* по време на растителна трансформация.

Транспозицията на Tnt1 се реактивира по време на in vitro регенерация чрез ИСЕ

Реактивиране на транспозицията на *Tnt1* ретроелемента от тютюн по време на *in vitro* регенерация е доказана в няколко хетероложни растителни вида соя, картоф, маруля, дива люцерна (Courtial *et al.* 2001; Cui *et al.* 2013; d'Erfurth *et al.* 2003; Duangpan *et al.* 2013; Mazier *et al.* 2007; lantcheva *et al.* 2009a). Нашите изследвания потвърждават, че в процеса на регенерация на *L. japonicus* чрез ИСЕ *Tnt1* успешно се транспозира. Създадените стартиращи линии се характеризират с добър регенерационен потенциал, което прави възможно получаването на регенеранти от стартиращите линии и изследване на възможността ретроелемента да се транспозира чрез ИСЕ. Разработеният нов регенерационен протокол за *L. japonicus* е създаден за ефективно транспозирание на *Tnt1*, като за тези експерименти за реактивиране са подбрани стартиращите линии St3, St6 и St11 (Фиг. 10), а техните регенеранти и T₁ потомство отново са анализирани. Транспозиционните профили на случайно подбрани регенеранти R₁₂, R₁₄ и R₁₈, регенерирани от линия St11 (с 4 *Tnt1* инсърта) и регенерантите R₁₃, R₁₅ и R₁₆ регенерирани от линия St3 (с 2 инсърта), както и R₆ регенериран от линия St6 (с 8 *Tnt1* инсърта) са анализирани. Регенерираните линии R₁₂ и R₁₄ съдържат 3 и 4 нови *Tnt1* инсърта сравнени с изходната стартираща линия St11. При регенерант R₁₃, са отбелязани 2 нови инсърта, а при R₁₅ са отчетени 4 нови транспозиции. Честотата на транспозирание в генома на *L. japonicus* ecotype B-129 Gifu вследствие на *Tnt1* реактивиране варира от 1 до 4 нови копия и е значително по-ниска от тази отчетена при *M. truncatula* cv. Jemalong, където се наблюдават от 8 до 12 нови транспозиции след *in vitro* регенерация от стартираща линия с 8 копия.

Фигура 10. IPCR на *Tnt1* стартиращи линии . Брой на *Tnt1* копия: пътека 1 и 2, St1 с 1 копия; St3 с 2 копия; пътека 3, St6 с 8 копия; пътека 4, St7 с 3 копия; пътека 5, St8 с 4 копия; пътека 6, St9 с 5 копия; пътека 7, St11 с 4 копия; пътека 8, St12 с 7 копия; пътека 9, St13 с 5 копия; пътека 11, отрицателна контрола; пътека 12, ДНК маркер.



***Tnt1* инсъртите са стабилни и се унаследяват в T_1 потомството**

Добре развитите *in vitro* растения от стартиращите линии и техните регенеранти са адаптирани в оранжерийни условия с цел получаване на потомство. Растенията се характеризират с нормален период на цъфтеж и образуват шушулки. Единствено регенерант R_6 получен от стартираща линия St_6 е стерилен и при него не е получено потомство. T_1 потомство е получено от всички стартиращи линии и техните регенеранти.

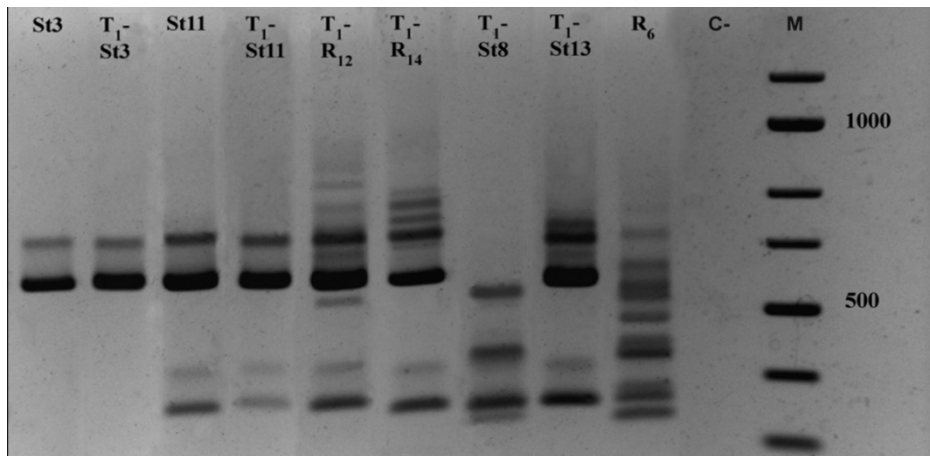
Семена от T_1 от няколко от стартиращите линии и семена от техните регенеранти са покълнати на селективна среда в присъствието на 5.5 mg/l хигромицин. Изследваните линии показват разпадане в съотношение 3:1 с изключение на T_1 потомството на St_6 и St_{13} , при които е наблюдавано разпадане в съотношение 1:1. Допускаме, че това отклонение от очакваното разпадане може да се обясни с малката анализирана семенна популация (само по 12семена).

Ретроелемента *Tnt1* би бил подходящ инсерционен мутаген за създаване на колекция мутанти от *L. japonicus* само ако *Tnt1* остава стабилен по време на растителното развитие и в полученото потомство. За да потвърдим стабилността на ретроелемента сравнихме транспозиционния профил на някои стартиращи линии с този по време на отглеждането им в оранжерия и в полученото потомство чрез IPCR анализ. Транспозиционният профил на T_1 потомство на регенерантите R_{14} и R_{12} и стартиращите линии (St_3 , St_{11} , St_8 и St_{13}) е представен на Фиг. 11. Не са отбелязани нови транспозиционни събития по време на растежа, както и в потомството, което е потвърждение, че *Tnt1* ретроелемента е не активен по време на жизнения цикъл.

Секвениране на фланкиращите последователности (FSTs)

За да докажем, че *Tnt1* се включва в генома и има и попадения в кодиращи участъци, ДНК проби от потомството на две стартиращи линии и регенерант R_6 са изпратени за секвениране в лаб. на Проф. Паскал Рате. Фрагментите (FSTs) получени от IPCR експериментите на линии R_6 , T_1 St_3 и T_1 St_{12} са клонирани и секвенирани. Секвенирани са общо 18 фрагмента. Както е посочено по-горе фрагментите отговарят на автономни копия на *Tnt1* ретроелемента с две до няколко базови двойки между двата гранични повтора са получени и при трите линии (10 секвенции общо). Свързани *Tnt1* гранични повтори с T-DNA също са открити и в трите линии. От линия T_1 St_3 са получени 4 секвенции представляващи еднакъв FST фрагмент и кореспондиращ на *Tnt1* инсърт в предполагаем ген. Тези секвенция (493 bp) не е представена като част от генома на *Lotus* в достъпните бази данни но кореспондира на предполагаем ген кодиращ цитохром P450, и показва висока хомоложност (90% съвпадане на АК) с цитохром P450 (XP_006596023.1) ген от соя *Glycine max*. Секвенцията на този IPCR фрагмент са идентифицирани 5 bp повтори (TTTTC) характерни за *Tnt1* транспозицията. Този резултат показва, че *Tnt1* е активен в тази линия и може да се включва в кодиращи участъци от ДНК.

Фигура 11. PCR на подбрани стартиращи линии, регенерирани линии и T₁ потомство: пътека 1, St3 в оранжерия; пътека 2, T₁ на St3; пътека 3, St11 в оранжерия; пътека 4, T₁ на St11; пътека 5, T₁ на R₁₂; пътека 6, T₁ на R₁₄; пътека 7, T₁ на St8; пътека 8, T₁ на St13; пътека 9, R6 регенерант на St6; пътека 10, отрицателна контрола C-; пътека 11, ДНК маркер.



Създадената малка колекция от *Tnt1* инсерционни мутанти при *L. japonicus* екотип *B-129* Gifu, включва стартиращи линии с малък брой копия на ретроелемента получени чрез трансформация с *A. tumefaciens*, регенеранти на стартиращите линии с нови копия на ретроелемента. Включените *Tnt1* копия са неактивни през жизнения цикъл на растенията и стабилно се унаследяват в потомството. Не на последно място по важност е и създаденият протокол за ефективна трансформация/регенерация при второто моделно растение на семейство бобови. Този протокол е успешно използван в изследванията ни по функционална и сравнителна геномика при моделни бобови представени в някои от публикациите ни (Revalska *et al.* 2015; Revalska *et al.* 2017; Boycheva *et al.* 2016, Boycheva *et al.* 2015).

V. Идентифициране на нов *MERE1-1*, активен ретроелемент в *Medicago truncatula*

Идентифицирането на ретроелемента *MERE1-1* е установено при съвместни изследвания с групата на Проф. Паскал Рате, и проведените анализи са извършени в И-та по Растителна Наука към Центъра за Научни Изследвания, Жив-сюр-Ивет, Франция.

Medicago truncatula сориа-лице ретроелемента наречен *MERE1-1* (*Medicago RetroElement1* copia 1) е намерен, като инсърт в *NSP2* гена, един от гените отговорни за процеса на симбиотична азотфиксация. При скриниране на мутанти линии в колекция от T-DNA мутанти (Scholte *et al.* 2002), е открит не грудкообразуващ мутант (*nod*) наречен (*ms219*) (Brocard *et al.* 2006). При тази мутантна линия установихме, че соматоналната мутация не отговаря на включването на T-DNA в тази линия. Няма деформиране на кореновите власинки или във формирането на кореновите примордии след инокулиране с *Sinorhizobium meliloti*, което индикира, че процеса на симбиотично азотфиксация е блокиран в много ранен етап. Експресията на маркерни гени характерни за началото на развитието на кореновите грудки (*ENOD11*: Journet *et al.* 2001; *ENOD12*: Journet *et al.* 1994; *MtN6* and *Rip1*: Cook *et al.* 1995) отсъства (*ENOD11* и *ENOD12*) или е редуцирана (*MtN6* и *Rip1*) при мутанта, след въздействието на Nod фактора. Сравняването на мутантна линия *ms219* и други мутантни линии по гени характерни за активиране на сигналната каскада при възприемането на Nod фактора, *nfp* (Amor

et al. 2003), *dmi1*, *dmi2* и *dmi3* (Catoira et al. 2000), показва, че тези гени не са повлияни при мутантна линия *ms219*. Мутацията е локализирана, в 3 cM участък върху хромозома 3 граничещ с VACs AC149303 и AC126782. Този участък от генома включва *NSP2* гена (Kalo et al. 2005). Предполагаемият мутирал ген е разгледан, като кандидат ген участващ в симбиотичната азотфиксация, независимо от различния фенотип характерен за *nsp2 mutant* (разклонени власинки). Амплифицирането на кодиращата последователност на *NSP2* в ДНК от изолирана от независими *ms219* растения при използване на ДНК полимераза за амплифициране на големи фрагменти, показва, че *NSP2* секвенцията съдържа инсерт от приблизително 5.3 kb, който е отговорен за мутацията. Последващото секвениране на този инсерт идентифицира ретроинтерпозон включен в bp1062 на кодиращата последователност на гена *NSP2*. Така идентифицираният ретроинтерпозон е наименован *MERE1-1*, идващо от „*Medicago Retro Element 1* - copy number 1“.

***MERE1-1* принадлежи към малко семейство *coria* ретроелементи**

Ретроелементът *MERE1-1* идентифициран в локуса на *NSP2* гена има дължина 5300 bp и два дълги крайни повтора (LTR) участъци от 574 bp (Фиг. 12a). Този елемент се огражда от 5 bp повтори в ДНК на гостоприемника кореспондиращи на target site duplication (TSD) повторени прицелни места. Отворената рамка на четене (ОРЧ) включва 1305 АК, и започва при bp 746 и завършва при bp 4660, и след *in silico* анализ показва високо сходство с GAG-POL протеините от ретровируси елементи от клас I. Позиционирането на обратната транскриптаза (RT) след ендонуклеазата (endo) класифицира *MERE1*, като *Ty1-copia* ретроинтерпозон.

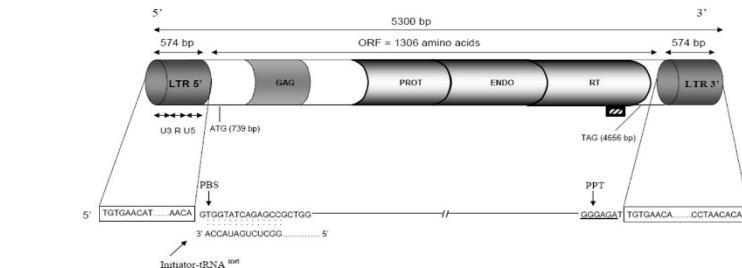
BLAST анализи чрез използване на данни от секвенции на генома на *M. truncatula* Jemalong допускат идентифицирането на 5 *MERE1* елемента, както следва *MERE1-1* to *MERE1-5* отговарящи на семейството Mt16 описано от Wang et al. (2008). *MERE1-1* отговаря на елемента инсертван в *NSP2* гена. Три от елементите (*MERE1-1*, *MERE1-3* и *MERE1-4*) имат отворена рамка на четене от 1305 АК. При секвенцията на *MERE1-2* една допълнителна база Т при нуклеотид 2852 създава съкратена рамка на четене 707 АК. При секвенцията на *MERE1-5* има стоп кодон на позицията 1950 в резултат на което се получава ОРЧ от 425 АК. Трите *MERE1* елемента (*MERE1-1*, -3, -4) имат пълни ОРЧ и могат да бъдат активни ретроелементи, а другите два са неактивни. Сравняване секвенцията на дългите крайни повтори LTR при *MERE1* семейството показва високо консервативен U5 участък, но доста различия има в U3 промоторния участък (Фиг. 12b). Сред описаните пет елемента при *MERE1-1*, *1-2* и *1-3* има идентичност на дългите крайни повтори LTRs. При двата LTRs от *MERE1-4* има 3 bp разлики, докато при *MERE1-5* LTRs има 6 bp разлики.

Фигура 12. Структура на *MERE1-1* ретроелемента представител на *MERE1* семейството.

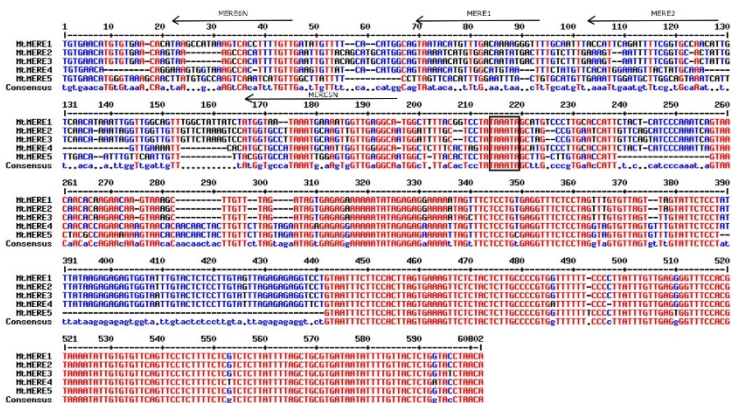
(А) Схематично представяне на *MERE1-1*. Сивите кутийки представляват дългите крайни повтори (LTR), разделени на три части: U3 (промотор), R (polyadenylation сигнал) и U5. Затъмнените сиви цилиндрични кутийки индикират последователността на областите кодиращи характерните протеини на ретроинтерпозона. От N- до С краен участък, *MERE1-1* ОРЧ показва хомология на АК с копия GAG (структурни белтъци), PROT (протеаза включена в зреещото на GAG белтъци), ENDO (ендонуклеаза включена в интегрирането в ДНК на гостоприемника) и обратна транскриптаза (RT) домейни. Предполагаемото място за свързване на праймери (PBS) и поли пуринов тракт (PPT), необходими за ДНК синтеза на ретроинтерпозона, както и комплиментарния участък между PBS и 3' края на метилирана транспортна РНК /tRNA^{met}/ от бобови.

(Б) Сравняване последователностите на дългите крайни повтори LTRs от *MERE1-1* до *MERE1-5*. Участъкът U5 показва висока степен на идентичност между 5 секвенции, докато участъкът U3 показва значителна вариабилност. Предполагаемата TATA box е очертана. Позицията на различните нуклеотиди използвани в това изследване са посочени със стрелки над секвенцията. MERE6N и 5N представляват позицията на специфичните олигонуклеотиди MERE61, 62, 63, 64, 51 и 52 (секвенциите са описани в материал и методи).

A



B



MERE1 се транспозира в *Medicago truncatula* мутантни линии регенерирани *in vitro*

Ретроелемента *MERE1* е с малък брой копия и стабилен в див тип растения от *Medicago truncatula*, затова допуснахме, че транспозирането му в *NSP2* гена е индуцирано от *in vitro* регенерацията на трансгенните растения. За да изключим, че транспозирането на *MERE1* елемента е ограничено само до *ms219* pod⁺ мутант, изследвахме мутантни линии от различни колекции генерирани чрез *in vitro* култивиране, за да установим наличието на *MERE1* в тези линии.

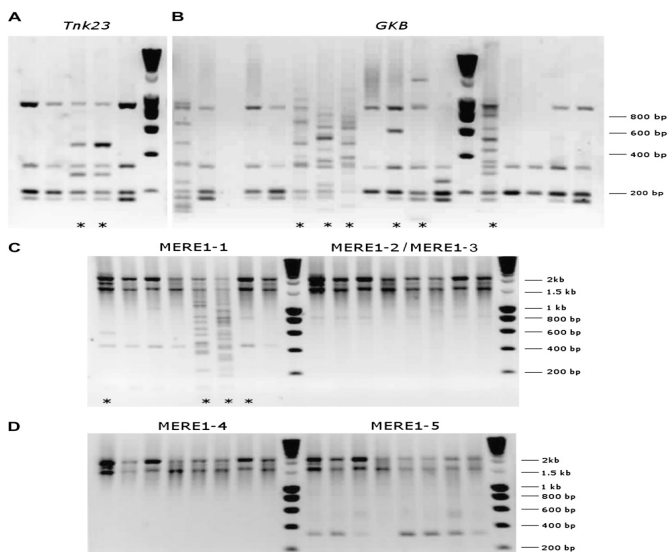
Транспозицията на *MERE1* е изследвана първо в две колекции от *Medicago* R108: *Tnt1* R108 колекция (250 *Tnk* мутантни линии, d'Erfurth *et al.* 2003) и *T-DNA* колекция (500 GKB мутантни линии, Scholte *et al.* 2002; Brocard *et al.* 2006). Наличието на различни *MERE1* гранични фрагменти получени при този експеримент е доказателство за транспозиция в някои от изследваните мутантни линии (Фиг.13 а,б). Обобщените резултати от този експеримент потвърждават транспозицията в 73 от общо 183 анализирани растения или 40% растения с нови транспозиции с от 1 до 10 нови инсерта.

Активността на *MERE1* бе проследена и при *Tnt1* инсерционни мутантни линии получени чрез *in vitro* регенерация на *M. truncatula* cv. Jemalong 2HA. Подбрани са специфични праймери за 3' края на LTR за различните *MERE1* представители, които позволяват амплификация различните гранични участъци (*MERE1-2* и *MERE1-3*, *MERE1-4* не могат да бъдат различени чрез тази техника).

При този експеримент новите *MERE1* специфични фрагменти получени при някои от изследваните линии са индикатор за нови транспозиции в генома на регенерираните растения от тази колекция. Нови копия са получени само за *MERE1-1* елемента, което предполага, че само това копие може да бъде реактивирано чрез *in vitro* регенерация. (Фиг.13 с, d).

Medicago truncatula copia-like ретроелемента *MERE1-1* (*Medicago RetroElement1-1*) е установен като инсерция в симбиотичния ген *NSP2*. *MERE1-1* принадлежи към нискокопийно емейство ретротранспозони в генома на *Medicago truncatula* представено от *MERE1-1*; 1-2; 1-3; 1-4; 1-5. Тези елементи са са тясно свързани, но само при три от тях съществува цялостен кодиращ регион, а полиморфизъм се наблюдава между дългите крайни повтори на тези копия. Това семейство ретротранспозони е представено при всички тествани *M. truncatula* екотипове, както и във второто моделно растение *Lotus japonicus*. Само *MERE1-1* е активен по време на *in vitro* регенерация при двата *Medicago truncatula* генотипа R108 и Jemalong използвани за създаването на колекции от инсерционни мутанти. При тях *MERE1-1* се включва предпочитано в гените.

Фигура 13. Транспозон дисплей анализ на *MERE1* елементи в *in vitro* регенерирани растения. Тотална ДНК е смляна с *AseI* рестрикционен ензим. Допълнителните фрагменти наблюдавани в линиите са маркирани със звездички отговарят на нови инсерционни места на *MERE1*. Бендове по-големи от 1,500 bp са артефакти на PCR реакцията. **А**, Tnk23 регенерирани растения от *Tnt1* колекцията (R108 генотип); 5 от 23 анализирани растения са показани. PCR амплификацията е направена с двойки праймери MERE51+MERE52/*AseI* и MERE61/*Ase2*. **В**, GKB регенерирани растения от T-DNA колекцията (R108 генотип); 16 от 39 анализирани растения са показани. PCR амплификацията е направена двойки праймери MERE51+MERE52/*AseI* и MERE61/*Ase2*. **С и Д**, Транспозиция на различните *MERE1* елементи в регенерирани 2НА Jemalong растения. Показан е профилът на 8 от 96 анализирани линии. PCR амплификацията е направена двойки праймери MERE51+MERE52/*AseI* за PCR1 последван от MERE61/*Ase2* за MERE1-1, MERE62/*Ase2* за MERE1-2/MERE1-3, MERE63/*Ase2* за MERE1-4, и MERE64/*Ase2* за MERE1-5 за PCR2. *мутантни линии с нови транспозиции на *MERE1-1*



VI. Права генетика. Проучване фенотипа на подобрани *Tnt1* мутантни линии

Проучването на част от *Tnt1* мутантните линии от колекцията на Функционална Генетика Бобови, АБИ се базира на двете основни стратегии „права и обратна генетика“ и започва с изпълнението на проекти Зърнено-Бобови и ИФКОСМО. Резултатите от това проучване са публикувани в наши и международни списания с импакт фактор (Iantcheva *et al.* 2009a; Iantcheva *et al.* 2009b; Vassileva *et al.* 2010; Revalska *et al.* 2011; Iantcheva *et al.* 2014; Boycheva *et al.* 2014; Revalska *et al.* 2015; Boycheva *et al.* 2015; Iantcheva *et al.* 2015; Iantcheva *et al.* 2016; Revalska *et al.* 2016a; Boycheva *et al.* 2016; Revalska *et al.* 2016b; Revalska *et al.* 2017; Iantcheva and Revalska 2018; Revalska and Iantcheva 2018a; Revalska and Iantcheva 2018b, Iantcheva and Revalska 2019), както и са основа за иницирирането на три нови проекта стартирали в началото на 2017 и 2018 година, финансирани от ФНИ, МОН.

Фенотипна оценка на селектирани мутантни линии

Колекцията от инсерционни мутанти при *M. truncatula* е ценен ресурс при изследване функцията на гените при бобови растения. Установяването на нови копия на *Tnt1* ретротранспозона в регенерираните линии от колекцията е потвърдено чрез PCR базирани методи транспозен дисплей (TD) и обратен двустапален (IPCR). В дисертационният труд е представено морфологичното охарактеризиране на 11 линии, като за целта са използвани критериите за оценка на мутантни линии (Таб. 5) от колекцията на *M. truncatula* R108, Noble Foundation, представени в публикацията на Tadege *et al.* (2008). Предварително проведените анализи (TD, IPCR), доказват наличието на нови включения на *Tnt1*, различни от тези на стартиращата линия А и В. От всяка тествана изходна линия: напр. T₀ 5106А-1 (където T₀ 5106А е изходната линия от колекцията, а 1 е растение 1 засадено за получаване на семена /от 1 до 8 клонирани T₀ растения са засадени от всяка линия за получаване на семена/) на случаен принцип от семената на растение 1 до 8 са подобрани по 10 семена от растение от T₁ или T₂ поколение (напр. T₁ 5106А-1 или T₂ 5227А-2). Номерацията на мутантните линии е идентична с тази от колекцията на АБИ за проекта Зърнено-Бобови, а номерата, са запазени и в дигиталната колекцията на секвенирани инсерционни мутанти (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database>) на Нобеловата фондация, като българските линии са с номера между 5000 и 6000 и включват един допълнителен индекс пред номера напр. So5945 /индекс за София, България/. Номерацията на линиите е същата и в семенните банки в Сегед, Унгария и Дижон, Франция.

Подбраните за фенотипна оценка 11 мутантни линии са (T₁ 5106А-1, T₁ 5628А-1, T₁ 5644А-1, T₁ 5938А-1, T₁ 6120А-1, T₁ 6123А-2, T₁ 6124А-3, T₁ 6142А-1, T₁ 6142А-3, T₁ 6142А-4, T₁ 5945А-1, T₁ 5945А-2, T₁ 5945А-4, T₁ 5945А-5, T₂ 5048А-1, T₂ 5227А-2, T₂ 5227А-3). Като контрола при охарактеризирането на *M. truncatula* *Tnt1* мутантни линии е използвана стартираща линия с 8 броя копия линия А, която е една от изходните линии за създаване на колекцията (Iantcheva *et al.* 2009a). Стартиращата линия А не показва отклонения от контролната линия *M. truncatula* 2НА див тип, както в морфологично, така и във физиологично отношение.

Таблица 5. Морфологични критерии за оценка на отбрани 11 мутантни линии

Основни фенотипни характеристики при *M. truncatula*

Симбиотични показатели

Необразуващи грудки - T₁ 6123А-2, T₁ 6124А-3

Свърхпродукция на грудки (повече от обикновено)

Неазотфиксиращи грудки (бели грудки) - T₁ 5106А-1, T₁ 5628А-1, T₁ 5644А-1, T₁ 5938А-1, T₁ 6120А-1, T₁ 6142А-1, T₂ 5048А-1, T₂ 5227А-2

Видоизменени грудки (палкообразни, кафяви/черни, големи)

Морфология

Силно изразен джуджевиден хабитус - T₁ 5628А-1, T₁ 6142А-3, T₁ 6124А-3

Средно изразен джуджевиден хабитус - T₁ 5106A-1, T₁ 5644A-1, T₁ 6120A-1, T₁ 6123A-2, T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5 T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5 T₂ 5048A-1, T₂ 5227A-2

Недоразвит джуджевиден хабитус - T₁ 5628A-1p2

Различно разклоняване и късен цъфтеж - T₁ 6142A-1, T₁ 6142A-4

Епинастни листа - T₂ 5227A-2, T₂ 5227A-3

Разноцветни листа - T₂ 5048A-1

Хлоротични листа - T₁ 5644A-1, T₁ 5938A-1

Къси и компактни корени

Деформирани корени - T₁ 6124A-3, T₂ 5048A-1

Дълги и тънки корени - T₁ 5106A-1, T₁ 5628A-1, T₁ 5644A-1, T₁ 5938A-1, T₁ 6120A-1, T₁ 6123A-2, T₁ 6142A-1, T₁ 6142A-3, T₁ 6142A-4, T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5 T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5, T₂ 5227A-2

Развитие и цъфтеж

Еднолистни и скъсени цветоноси

Многолистни (4 или 5 листа) - T₁ 6142A-3

Късноцъфтящи

Храстовидни, късноцъфтящи

Храстовидни-нецъфтящи (липса на стебла)

Ранноцъфтящи - T₁ 5628A-1, T₁ 5106A-1, T₂ 5048A-1, T₁ 6124A-3, T₁ 6142A-1, T₁ 6142A-3, T₁ 6142A-4

Дефектни цветоноси и цветове - T₁ 6142A-3, T₁ 6123A-2, T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5 T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5

Пигментация

Пурпурни листа (повече антоциан) - T₂ 5048A-1

Жълто до светлозелени (малко антоциан) - T₁ 6142A-1, T₁ 6142A-3, T₁ 6142A-4, T₂ 5227A-2, T₂ 5227A-3

Бледозелени листа (светли или жълто-зелени) - T₂ 5938A-1-5, T₂ 5628A-1-1

Тъмnozелени листа

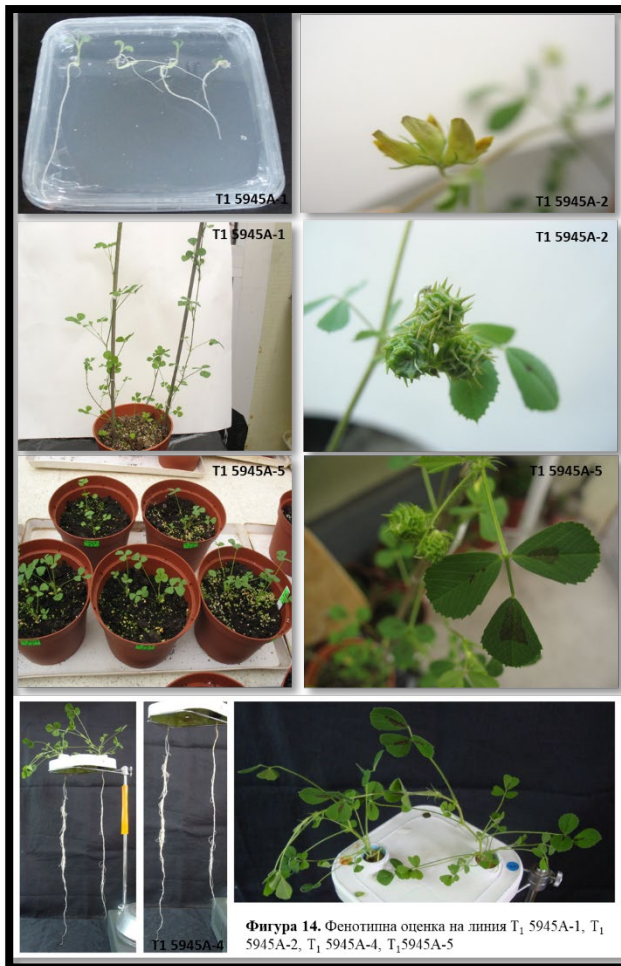
Албиноси

Фенотипното охарактеризиране на *Tnt1* мутантните линии предоставя възможност за идентифициране промени в растителната морфология и допуска да се направи връзка между наблюдавания фенотип и гени участващи в растителното развитие, процеса на азотфиксация или регулаторните пътища. Този подход на изследване е основен в стратегията на „правата генетика“. При охарактеризирането на фенотипа се натрупват много данни, и снимков материал, които са предпоставка за създаване на каталог на мутантните линии.

Подбраните *Tnt1* мутантни линии са засадени в оранжерия за оценка на растителната морфология, растеж, цъфтеж и пигментация за два последователни жизнени цикъла напр. на T₁ и последващото T₂ потомство, като резултатите са онагледени с таблици и фигури. В настоящия автореферат са представени само две фигури, илюстриращи резултатите от проучването на две от подбраните линии (Фиг. 14, 15).

След двуеганната оценка направена при оранжерийни условия се оформят няколко фенотипни класове свързани с морфологията на надземната част: линии характеризирани се с джуджевиден и средно джуджевиден растеж (Таб. 5). В този фенотипен клас попадат почти всички изследвани линии. От особен интерес е линия T₁ 6142A-3, T₁ 6124A-3 растение 2 и T₁ 5628A-1 растение 2, последните две се характеризират с ясно изразен джуджевиден и недоразвит джуджевиден хабитус. Вторият фенотипен клас се състои от линии с изменени или дефектни цветове, жълти и жълто-зелени листа, многоцветни листа, ранен цъфтеж, трилистни и многолистни листа. Особен интерес представлява

линия T₁ 6142A-3, при която се наблюдават отклонения в периода на цъфтеж, формата на цветовете, цвета и броя на листата в триделния лист. Всички растения от тази линия са стерилни. Растежа и морфологията на корена, както и симбиотичния профил на изследваните линии са оценени в условия *in vitro*, както и в аеропонна култура и хидропонна култура. Симбиотичния профил на 8 от изследваните линии (T₁ 5106A-1, T₁ 5628A-1, T₁ 5644A-1, T₁ 5938A-1, T₁ 6120A-1, T₁ 6142A-1, T₂ 5048A-1, T₂ 5227A-2) се характеризира с бели нефункционални грудки (Nod⁺, Fix⁻), мутанти по способността да фиксират атмосферен азот. Две от линиите не формират коренови грудки (Nod⁻), T₁ 6123A-2, T₁ 6124A-3. Едната от тези две линии T₁ 6123A-2 е възприемчива за бактерията симбионт, ризобиялните бактерии навлизат в растението-гостопримник, но инфекциозни нишки не прогресират и не се наблюдава образуване на грудкова примордия. При линия T₁ 6124A-3 не се наблюдава

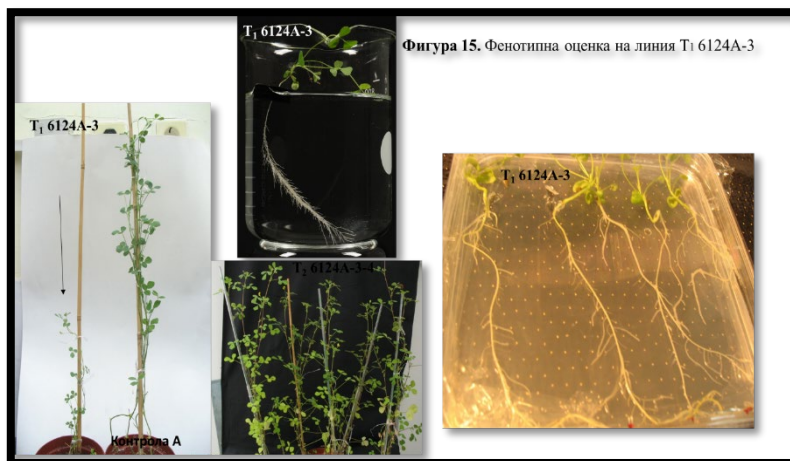


Фигура 14. Фенотипна оценка на линия T₁ 5945A-1, T₁ 5945A-2, T₁ 5945A-4, T₁ 5945A-5

формиране на коренови грудки (Фиг.15) . Линия Т₁ 5945А-1, Т₁ 5945А-2, Т₁ 5945А-4, Т₁ 5945А-5 се формират грудки, като част от тях са функционални, тоест способни да фиксират атмосферен азот (Фиг.14).

Девет от изследваните линии попадат в група с показател дълги, тънки и незаклонени корени. Две от линиите попадат в групата с деформирани корени. Особен интерес представлява линията Т₁ 6124А-3, която се характеризира със специфична коренова морфология, при която вторичните коренови разклонения са разположени паралелно от двете страни на главния корен наподобяващи рибена кост (Фиг. 15). Заради интересния си коренов профил тази мутантна линия е наречена „Рибена кост“ и изолирана от нея ДНК е изпратена в лабораторията на Проф. Паскал Рате за секвениране на фрагментите с *Tnt1* и *MERE1-1* фланкиращи последователности на инсъртите.

Секвенирани са общо 42 фрагмента от тях 32 отговарящи на автономни копия на *Tnt1* и *MERE1-1* ретроелемента с от няколко до няколкостотин бази от генома на линия Т₁ 6124А-3 между двата гранични повтора. От *Tnt1* са получени 14 секвенции представляващи автономни копия на ретроелемента, а от *MERE1-1* са получени 18 секвенции. Един от секвенираните фрагменти А32-18 е *MERE1-1* инсерт, секвенцията е с големина (494 bp) и в достъпните бази данни кореспондира на ген кодиращ *WAT1* (Walls are thin 1) *related protein* (Ranocha *et al.* 2010), AT5G07050, от *Arabidopsis thaliana*, ортолог на *nodulin 21*, *MtN21* от генома на *Medicago truncatula*, Medtr8G041390, транспортен протеин с мембранна локализация. Растителните гени, чиято експресия се индуцира при бобови от симбионтната бактерия от род *Rhizobium* по време на процеса на грудкообразуване са определени като нодулини „nodulins“. Изследване на Паскал Гама и съав. от 1996 (Gamas *et al.* 1996) определя 29 гена, чиято експресия е свързана със взаимодействието на растението с бактерията, тези гени са определени, като нодулини (*MtN1–MtN29*). В същото изследване е идентифициран и *MtN21* при диференциален скрининг на транскрипти от коренови грудки в присъствие на симбионта *Sinorhizobium meliloti*. Нодулин подобни протеини са установени и при други растителни видове *Arabidopsis*, топола, ориз, царевица. В генома на *Arabidopsis* са установени голям брой ‘nodulin’ подобни гени, 132. При бобови ‘nodulin’ гените са пряко свързани с ранните етапи на процеса на азотфиксация, като например *Enod11* (Svistonoff *et al.* 2010), но при останалите растителни видове тези гени участват в различни аспекти на растителното развитие, като транспорт на хранителни вещества, соли, аминокиселини и хормони.



Досега е известно, че ортолог на *NODULIN 21* от бор се индуцира от ауксин и участва в процеса на вторично корено образуване (Busov *et al.* 2004). Наличните проучвания в литературата позволиха да допуснем, че *Min21* участва в процеса на грудкообразуване и се индуцира от ауксин. Установеният симбиотичен профил в аеропонна култура, на мутантната линия T₁ 6124A-3 е (Nod⁻) не формира грудки и е с характерен фенотип по брой и разположение на вторичните корени. В допълнение е проведен експеримент с инокулиране с *Sinorhizobium meliloti* в условия *in vitro*. Направените наблюдения на кореновия растеж 30 дни след инокулиране потвърдиха липса на грудкообразуване (Фигура. 16 А). Тези резултати, информацията от секвенирането и данните в литературата станаха предпоставка за провеждане на експеримент по комплементиране на мутантния фенотип, чрез индуциране на несъщински корени “hairy roots” с *Agrobacterium rhizogenes* носещ вектор за свръхекспресия на ген кодиращ ауксинов трансмембранен преносител *MtLAX3* (35SMtLAX3::GFP). Предположихме, че свръхекспресия на този ауксинов преносител би комплиментирала мутантния фенотип и ще възстанови формирането на грудки. За целта са създадени „композирани растения“, при които кореновата част на мутантната линия е елиминирана, основата на растението е заразена с *Agrobacterium rhizogenes* носещ вектор за свръхекспресия на *LAX3* (35SMtLAX3::GFP) и са продуцирани “hairy roots”. Появата на първите несъщински корени се наблюдава след около 10 дни. Получените корени се характеризират с наличието на много власинки и изглеждат по-пухкави. Те растат бързо на основна хранителна среда, а доказването на трансгенната им природа е лесно след сканиране с флуоресцентен скенер. За период от 20 дни тези корени порастват достатъчно и са заразени със симбионтната бактерия (Фигура 16 В). 18-20 дни след заразяването по корените се наблюдават топчести грудкоподобни структури, каквито не се образуват при мутантната линия. При наблюдение с микроскоп стереоскоп се вижда, че от тези структури започва формиране на адвентивни корени (Фигура 16 С, D). Наблюдава се формиране на един или два адвентивни корена от грудкоподобните структури. Експресията на ауксиновия трансмембранен преносител иницира образуването на грудкоподобни структури, но тези структури нямат идентичност на грудки, не са функционални и развитието им продължава с формиране на адвентивни корени. Подобни структури – коренови грудки загубили своята идентичност, които формират корени от собствената си проводяща система се наблюдават при двойни мутанти *Mtnoot1noot2* по гените *MtNOOT1* и *MtNOOT2*, които определят идентичността на формираните грудки (Magne *et al.* 2018).

Генетичните подходи се използват рутинно за проучване на взаимодействието растение-бактерия и органогенеза на кореновите грудки. При тези изследвания се генерират основно неформиращи грудки мутантни растения (nod⁻) или мутантни растения формиращи нефункционални грудки (fix⁻). Nod⁻ мутантните линии позволяват идентифицирането на гените отговорни за първите етапи от взаимодействието (растение-бактерия разпознаване) и началото на органогенеза на грудките. Освен тези две основни групи мутантни линии е идентифициран и *Medicago* мутант наименован *noot* (*nodule root*), който развива корени от апикалната част на кореновите грудки (Couzigou *et al.* 2012; Couzigou *et al.* 2013). Този мутант предоставя възможност, да се проучи идентичността на кореновите грудки при бобовите растения формиращи грудки от недетерминиран тип на молекулно ниво. Промяната на идентичността на органа става в началото на процеса на инициране на грудките и представлява интересен генетичен модел за разбиране на процеса на формиране и произход на симбиотичните грудки (Hofer and Ellis, 2014, Magne *et al.* 2018).

VII. Обратна генетика. Клониране и функционално охарактеризиране на подобрени гени

Дешифрирането на функцията на растителните гени и ролята им в проучвания геном е обект на функционалната геномика. Изследванията по функционална геномика изискват наличие на колекции от мутантни линии и се базират на две стратегии права и обратна генетика. В предишния раздел от резултатите са отразени изследвания свързани с фенотипа на мутантните линии, а информацията получена от секвенирането им предполага идентифицирането на определени гени и възможност за проучване на функцията им в генома на изследваното растение.



Както е отбелязано по-горе фланкиращите последователности, които ограждат част от геномната ДНК *Tnt1* (Flanking Sequence Tag, FST) могат да бъдат идентифицирани чрез PCR базираните методи транспозонен дисплей и обратен двустапален PCR (TD и Inverse PCR). Тези FST се съхраняват в база данни на Нобеловата Фондация „Samuel Roberts Noble Foundation“ (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>). Малка част от *Tnt1* мутантните линии създадени в АБИ, също е част от тази база данни, а наличните секвенции са достъпни в <http://bioinfo4.noble.org/mutant>. В рамките на двата проекта координирани от Агробиоинститут и финансирани от ФНИ в конкурсите 2008г., ДО-268- „ИФКОСМО“ и ДО 105 „Център за устойчиво развитие на растителната и животинска геномика“ под проект 7, част от задачите на научната програма включват клониране и изследване на функциите на гени участващи в растителното развитие при бобови. След проведен анализ на секвенираните мутантни линии са подбрани гените, които представляват интерес и са цел на планоуваното изследване (Iantcheva *et al.* 2009b, Revalska *et al.* 2011). При три от мутантните линии (So6142A, So5945A, So5828A), е установено включване на *Tnt1* в екзоните на гени. Проведеният BLAST анализ в специализираната база данни по сравнителна геномика за двусемеделни PLAZA3,0 <https://bioinformatics.psb.ugent.be> е установено, че секвенираните последователности отговарят на гените MT5G085330, 1 aminocyclopropane-1 carboxylate oxidase, (линия So6142A, инсърт 9, който през 2009 година според NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) е аотиран, като 2OG-Fe (II) oxygenase), MT7G105660, Histone acetyltransferase, transcription cofactor, (линия So5945A, инсърт 5), MT2G007220, F-box plant like protein преди аотиран като, Cyclin-like F-box protein, (линия So5945A, инсърт 7) и MT7G078300, Disease resistant protein (CC-NBS-LRR class), (линия So5828A, инсърт 1). Останалите три гена (MT3G072870, Auxin influx carrier protein, LAX3, MT5G040880, Auxin response factor, MT2G026250 GRAS family transcription factor) частично кореспондират с инсърт 5 на линия So5860A, инсърт 3 на линия So5928A и инсърт 6 на линия So5945A. В секвенираната линия So5823A инсърт 9 отговаря на ген кодиращ zinc finger CCHC type protein, NCBI AC140549. Тези гени са подбрани за клониране и проучване на функцията им, защото участват в основни процеси на растителното развитие и сигналните каскади напр. вторично коренообразуване, зреене на семената, симбиотична азотфиксация и соматичен ембриогенез, отговор към стресови фактори от околната среда, устойчивост към патогени, синтез и деградиране на етилен.

Изброените осем гена са клонирани и изследвани с цел определяне на функцията им в растителното развитие на моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, както и моделното растение *Arabidopsis thaliana*.

В дисертационния труд много накратко са описани изследваните гени, установените им функции в проведените изследвания, по-голяма част от които са публикувани или са в процес на изследвания в текущите проекти на групата по Функционална генетика -бобови. Подробно сравнително изследване на гена кодиращ F-box protein от моделните растения *M.truncatula* и *A.thaliana* е представено в настоящия труд.

Конструирани на вектори за експресия на подобраните гени, промотори и конструктори за инактивиране на генната експресия, TAP и ViFC анализи

За клонирането на изброените по-горе гени, техните промотори, конструкторите за инактивиране на генната експресия чрез RNAi и amiRNA методи, както и тези за TAP и ViFC анализите е използвана рекомбинантно-основаната технология Gateway™ (Invitrogen). Технологията е основана на специфична по място рекомбинантна реакция, опосредствана от λ фаг (Karimi et al. 2002). Подбраните ДНК последователности, фланкирани от рекомбинантните места „attB”, се прехвърлят в Донорни вектори (Donor vectors), съдържащи рекомбинантни места „attP” с помощта на „BP реакция”, в резултат на което се създава Входен клон (Entry clone). Той съдържа интересувашата ни последователност, фланкирана от „attL” места. Създаденият входен клон се прехвърля в „Дестинационни вектори” (Destination vectors), където рекомбинира с „attR” места чрез „LR реакция”, при което се конструира Експресионен клон (Expression clone).

За заглушаване функцията на изследваните гени и конструирани на *Medicago truncatula* трансгенни линии с инактивирана експресия по изследвания ген (knockdown) е използван методът RNAi (RNA interference/РНК интерференция). Механизмът е основан на присъствието на определени фрагменти от двойноверижна РНК, заглушаваща експресията на определен ген, чиято секвенция е хомоложна с тази на двойноверижната РНК. Малките двойноверижни РНК се наричат още малки интерфериращи РНК (siRNAs), отговарящи на последователността, която е част от секвенцията на екзон на инактивирания ген. За конструирани на трансгенни линии от *Arabidopsis thaliana* с инактивирана функция на гена *Atf-box-protein* е използван методът amiRNA. Синтетичните малки РНК „artificial micro RNAs (amiRNAs)“ са 21 вр малки RNAs, които могат да бъдат конструирани *in silico* и функционират, като специфично инактивират един или няколко гена представляващи интерес за изследвателя. Този метод се използва успешно при *Arabidopsis thaliana* и е приложен първоначално при това моделно растение (Schwab et al. 2006), а впоследствие и при други растителни видове (Ossowski et al. 2008).

Конструирани на трансгенни растения от *M.truncatula* с модифицирана експресия и носещи маркерните гени *GUS* и *GFP* под контрола на ендогенните промотори на изследваните гени

Генетична трансформация на *Medicago truncatula* cv. Jemalong 2HA е направена по два метода трансформация на клетъчна суспендиална култура (Iantcheva et al. 2014) и по метода на листните дискове чрез модифициран протокол отразен подробно в публикацията (Revalska et al. 2015). Получаването на трансгенните растения чрез тези методи за генетична трансформация са описани подробно в раздел генетична трансформация. Чрез трансформация на клетъчна суспендиална култура са получени трансгенни растения от *M.truncatula* – свръхекспресиращи (OE) *MtF-box-GFP*, и промоторни растения експресиращи маркерните гени *GUS* и *GFP* *pMtARFB3::GUS-GFP*, *pMtGRAS::GUS-GFP*, *pMtLAX3::GUS-GFP*. По метода генетична трансформация на листни дискове са получени трансгенни растения от *M.truncatula*: със свръхекспресия (OE) и инактивирана експресия (RNAi) и промоторни растения експресиращи маркерните гени *GUS* и *GFP* под контрола на ендогенни промотори от изследваните гени. *MtF-box-OE*; *MtF-box-RNAi*; *pMtDRP::GUS-GFP*; *pMtF-box::GUS-GFP*; *pMtHAC::GUS-GFP*.

Генетична трансформация на *Arabidopsis thaliana*

Генетичната трансформация на *A. thaliana* е извършена по методът на потапяне на цветовете (Clough and Bent 1998), осигуряващ ефективна трансформация на това моделно растение. По този

метод са конструирани трансгенни растения със свръхекспресия на *AtFbox*-OE-GFP и с инактивирана експресия *AtF-box*-amiRNA. За получаване на стабилни трансгенни растения по горе-посочения метод на генетична трансформация е изработена стратегия за получаване на хомозиготни T₃ семена чрез фенотипиране на T₁, T₂ и T₃ растения.

Участие на изследваните гени в процеса на соматичен ембриогенез

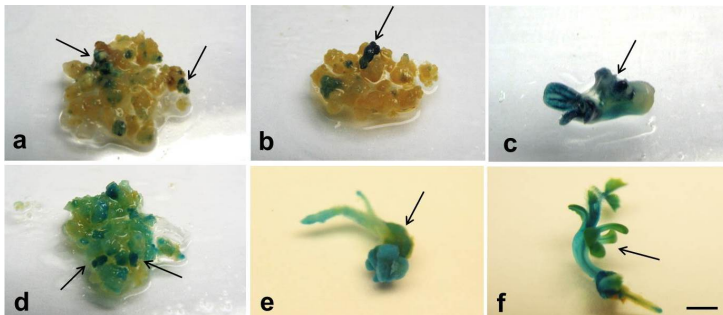
Дългогодишният опит, който групата по Функционална Генетика бобови има в изследванията на процеса на соматичен ембриогенез е предпоставка изследваните от нас гени да бъдат проучени и при индуцирането и развитието на соматични ембриониди чрез индиректен соматичен ембриогенез. Наскоро направеното транскриптомно проучване на зиготния ембриогенез при *M. truncatula* хвърля светлина върху гените участващи в процеса на развитие на зиготното ембрио, както и зрееенето на семената и определя изключително важната роля на някои транскрипционни фактори в зрееенето на семената (Kurduykov *et al.* 2014). При соматичния ембриогенез проучване върху клетъчните и молекулни механизми на процеса е публикувано наскоро от Rose 2019. Изследваните от нас гени не са проучвани по отношение на процеса на соматичен ембриогенез от други автори, а част от първоначалните резултати натрупани в хода на експерименталната работа са представени в наши публикации (Iantcheva and Revalska 2018; Boycheva *et al.* 2015; Boycheva *et al.* 2016). Тези резултати са предпоставка за бъдещи изследвания за проследяване на функционалната връзка на изследваните гени в контекста на процеса, както и други процеси случващи се по време на клетъчната дедиференциация и последващата диференциация. Проведените експерименти за изследване ролята на изучаваните гени при процеса на индиректен соматичен ембриогенез са направени с помощта на трансгенни растения носещи конструкции за локализиране на генната експресия чрез сливания на маркерните гени *GUS* и *GFP* под контрола на промоторите на изследваните гени от *M. truncatula* (*pMtLAX3::GUS-GFP*; *pMtARFB3::GUS-GFP*, *pMtF-box::GUS-GFP*; *pMtHAC::GUS-GFP*; *pMtGRAS::GUS-GFP*, *pMtDRP::GUS-GFP*).

Както вече е отбелязано в нашите изследвания потвърдихме изключително важната роля на ауксина 2,4-D в процеса на соматичен ембриогенез. По-голяма част от ауксина навлиза в клетките чрез повлечен транспорт през клетъчната мембрана с помощта на трансмембранни транспортери. Активирането на сигналната каскада от ауксин допуска участието на два от изследваните гени *MtLAX3* и *MtARFB3* в процеса на соматичен ембриогенез. Получените трансгенни растения експресиращи маркерните гени *GUS* и *GFP* под контрола на промотори от тези два гена, както и тяхното потомство са използвани за хистохимични анализи при проследяване на експресията на маркерния ген *GUS* в процеса на индиректен соматичен ембриогенез при *M. truncatula*. Активността на маркерния ген *GUS* под контрола на *LAX3* промотор е наблюдавана като точки при индуцирането на калусна тъкан по експланта, но постепенно силата на сигнала се усилва при формираните глобуларни ембриониди и става интензивен при ембриониди в стадий торпедо (Фиг.17 a,b). Активността на маркерния ген е отчетена и на по-късен стадий от развитието на соматичното ембрио - котиледонен стадий, като сигнала се наблюдава по цялата биполярна структура (Фиг.17 c). Ролята на ауксиновите трансмембранни преносители отговорни за навлизането на ауксина в клетката е добре документирана, както и комбинираното им действие с транспортерите за изнасянето на ауксина от клетката. Тези два вида транспортери са основни участници в транспорта на ауксин, делението на клетките и разпределението на ауксин през стадията на зиготен ембриогенез (Bassuner *et al.* 2007; Firml *et al.* 2002a; Jenic and Barton 2005). Комбинираното действие на мембранните транспортери, както и доказаната важна роля на ауксина в процеса на растителното развитие (Saini *et al.* 2013; Davis 2010; Quint *et al.* 2006) ни позволява да заключим, че изследвания от нас ген *MtLAX3* участва в процеса на соматичен ембриогенез.

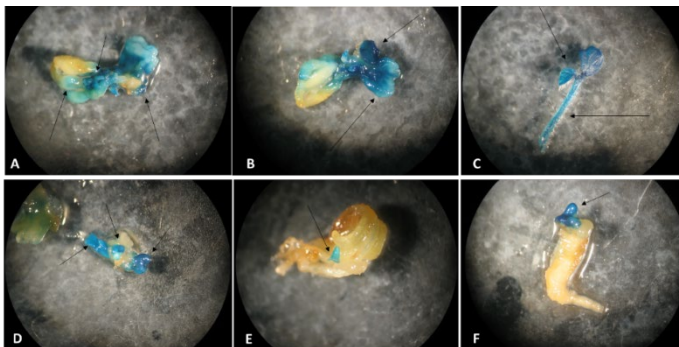
Участието на ауксин отговорните фактори в процеса на зиготен ембриогенез е доказано в изследването на Kurduykov и съавт. (2014). Проведените от нас анализи за проследяване на активността на маркерния *GUS* ген под контрола на промотор от изследвания *MtARF-B3* ген потвърдиха участието му в процеса на индиректен соматичен ембриогенез при *M. truncatula*. Слаб сигнал е наблюдаван първоначално при индуцирането на калусна тъкан по експланта, който става по-интензивен във формираните глобуларни ембриониди (Фиг.17 d) и последващото им развитие до

стадий торпедо и ранен и късен котиледонен стадий (Фиг. 17 е). Локализираната експресия на маркерния ген е по-слабо изразена във формираните малки растенийца, но се наблюдава по целия хабитус с добре оформена биполарна структура (Фиг. 17 ф).

Фигура 17. Процес на ИСЕ при *M.truncatula* визуализиран чрез експресия маркерния ген *GUS* под контрола на ендогенни промотори от *MtLAX* и *MtARF* гените pLAX::GUS-GFP (a,b,c) и pARF::GUS-GFP (d,e,f).



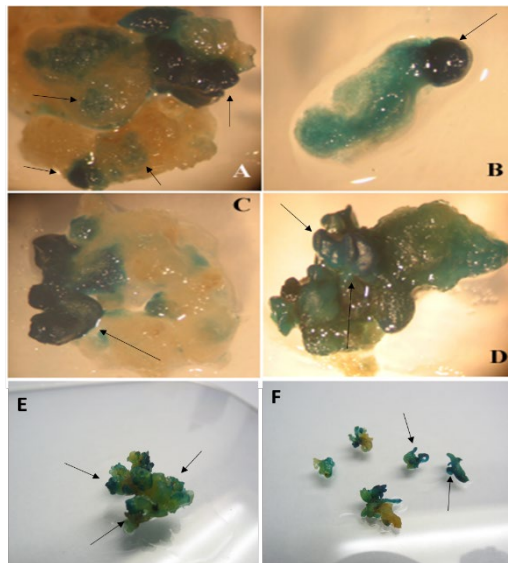
Експресията на маркерния ген *GUS* под контрола на промотори от изследваните гени *MtF-box* и *MtHAC1* също е проследена в процеса на индиректен соматичен ембриогенез. Под контрола на p*MtF-box* промотор сигнала от маркерния ген се наблюдава в оформените ембриогенни зони, както и във формираните глобуларни и торпедни ембриониди (Фиг.18А). Активността на маркерния ген е отчетена във формираните котиледонни листа, като интензитетът на сигнала нараства, а още по-силно е изразен в листата и листните дръжки на формираните малки растенийца (Фиг.18 В,С). Експресията на маркерния ген под контрола на p*MtHAC1* промотор е локализирана изключително във формираните ембриониди в стадий сърце, торпедо, като сигнала не е много интензивен (Фиг.18 D,E) а при котиледонните ембриониди с добре оформена би-полярна структура е локализиран единствено в котиледанните листа (Фиг.18 F).



Фигура 18. Процес на ИСЕ при *M.truncatula* визуализиран чрез експресия маркерния ген *GUS* под контрола на ендогенни промотори от *MtF-box* и *MtHAC1* гените pF-box::GUS-GFP (A,B,C) и pHAC1::GUS-GFP (D,E,F).

Семейството на GRAS транскрипционните фактори е многобройно и представено от много членове при различните растителни видове. В моделното растение *M. truncatula* към това семейство принадлежат 68 члена групирани в 16 групи (Song *et al.* 2017). Тези гени участват в различни процеси на растителното развитие, както и се свързват с отговора на растенията към абиотичен стрес. Няма литературни данни свързани с участието им в процеса на соматичен ембриогенез. Участието на изследвания ген кодиращ GRAS транскрипционен фактор в процеса на индиректен ембриогенез бе документирано във всички наблюдавани стадии чрез проследяване на експресията на маркерния *GUS* ген под контрола на промотора на гена. Сигнал е отчетен във формирания калус, като става по-интензивен при индуцираните ембриогенни зони (Фиг.19 А,В) и формираните в последствие ембриониди в стадий сърце и торпедо (Фиг.19 С,Д). Въпреки, че гените за устойчивост към болести се свързват предимно с тази им функция, експресията на изследвания ген /кодиращ Disease resistant protein CC-NBS-LRR/, проследена чрез маркерния *GUS* ген, също бе наблюдавана в различните стадии на соматичен ембриогенез. Сигнала е отчетен във формираните ембриогенни зони и става по-интензивен в оформящите се структури, като се наблюдава и при добре обособените би-полярни котиледонни ембриониди (Фиг.19 Е,Ф). Функциите на гените кодиращи Disease resistant protein притежаващи NBS-LRR и домейни се свързват с участието си и в други процеси от растителното развитие освен отговора към патогенни атаки.

Фигура 19. Процес на ИСЕ при *M. truncatula* визуализиран чрез експресия маркерния ген *GUS* под контрола на ендогенни промотори от *MtGRAS* и *MtDRP* гените pGRAS::GUS-GFP (А,В,С,Д) и pDRP::GUS-GFP (Е,Ф).



Направените хистохимични анализи за проследяване експресията на маркерния *GUS* ген под контрола на промотори на шест от изследваните гени в процеса на индиректен соматичен ембриогенез хвърля лека светлина по отношение на тяхната функция в процеса, но поставя и много въпроси, които могат да бъдат решени чрез задълбочени проучвания и многостранни анализи.

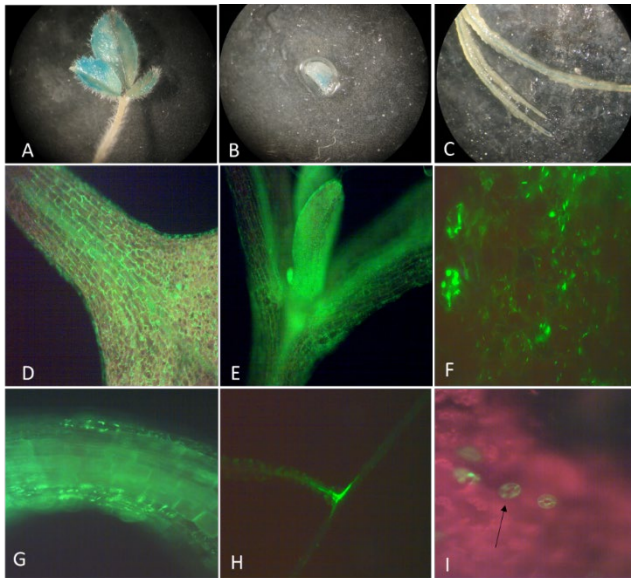
Транскрипционни профили на *MtF-box* и *AtF-box* гена в моделните трансгенни растения с модифицирана експресия

Много важна стъпка при изясняване функцията на изследваните гени е получаването на стабилни трансгенни растения с модифицирана експресия. Получените T₀ трансгенни растения от *M. truncatula* се подлагат на първоначален скрининг за присъствието на селективния ген *nr1ll* ген чрез провеждане на PCR анализи. Доказаните трансгенни растения са засадени в оранжерийни условия за получаване на потомство. Определянето на транскрипционния профил е от решаващо значение при провеждането на последващите функционални анализи. Селектират се от три до пет независими трансгенни T₁ линии с променени нива на транскрипт на *MtF-box*, които се използват и за последваща фенотипна оценка, както и пет независими трансгенни T₁ линии носещи *MtF-box* промотор, слят с маркерните гени *GUS* и *GFP* (*MtF-box::GUS/GFP*) са избрани за локализиране експресията на гена. Нивото на транскрипт при трансгенните T₁ ОЕ линии е слабо повишено, докато нивата на транскрипт при растенията с потисната експресия е отчетено значително понижаване на експресията в сравнение с контролата. За определяне на нивото на експресия при *AtF-box*-ОЕ семената от осем хомозиготни T₃ линии са покълнати, а семенните прорастъци са отгледани на селективна среда съдържаща канамицин. От *in vitro* растенията са отделени листа за последващ транскрипционен анализ, а растенията, които показват промяна в експресионния профил са засадени в оранжерия. Три от изследваните осем линии показват по-ясно изразено ниво на повишение на транскрипта 57/17, 58/14 и 60/17. Тези линии са използвани при последващите фенотипни и функционални анализи. Аналогично е направен подбора на линиите *AtF-box*-amiRNA с инактивирана експресия. От тях са селектирани три линии с най-ниско ниво на транскрипт 3/4; 3/3; 1/1.

Локализиране на експресията на *F-box* ген в трансгенни растения от двата моделни вида на различни етапи от растителното развитие

В потомството на трансгенни растения от *M. truncatula*, експресията на *GUS* маркерния ген под контрола на ендеогенния *F-box* промотор (*pF-box::GUS:GFP*) е установена, освен в различните етапите на процеса на соматичен ембриогенез и в млади листа листни зачатъци, първични корени и зачатъци на вторични коренови разклонения (Фиг.20 А,В,С). Сигнала за зелена флуоресценция е наблюдаван в трихоми на млади *in vitro* листа (Boycheva *et al.* 2015). Не е установена експресия на маркерния ген в азотфиксиращите грудки. Възможно е маркерния ген да се експресира на много ранни етапи от процеса на грудко формиране, когато се иницират примордиите на формиращите се структури. Тези ранни етапи на процеса не са проследени, но в зрели грудки не е локализиран сигнал. За разлика от *M. truncatula* при другото моделно бобово растение *L. japonicus* експресията на маркерния ген е отчетена в детерминирани зрели коренови грудки (Boycheva *et al.* 2015). При *A. thaliana* е проследена експресията на маркерния ген (*GFP*) за зелена флуоресценция слят с кодиращата последователност на изследвания ген *At-F-box-GFP*. Направените наблюдения с флуоресцентен микроскоп визуализират сигнала в епидермални клетки на листа, върхната част на растението, както и в трихомите, (Фиг.20 D, E). При наблюдение с по-голямо увеличение експресията е установена на субклетъчно ниво, като сигнала се наблюдава в хлоропластите на листните паренхимни клетки (Фиг.20 F), вторичните коренови разклонения в ендоплазматичния ретикулум и пластидите на кореновите епидермални клетки, както и в устицата на листата (Фиг.20 G, H, I).

Фигура 20. Експресия на маркерния *GUS* ген под контрола на ендеогенен промотор на *pMtF-box::GUS-GFP* от *M. truncatula* (А,В,С); експресия на маркерния *GFP* ген слят с кодиращата последователност на гена *At35S-F-box::GFP* от *A. thaliana* (D,E,F,G,H,I).



Получените резултати при двете моделни растения свързват експресията на маркерните гени с млади органи с интензивно делящи се клетки, което доказва участие на гена в растителното развитие, а субклетъчната локализация предполага и вероятното му участие в метаболитни пътища. Получените резултати са в потвърждение на вече публикувани изследвания за *A. thaliana*, които детайлизират *in silico* експресия на *Arabidopsis* SKP белтъци и различни F-box (FBX) белтъци в почти всички растителни органи включващи котиледони, апикална меристема на стъблото (SAM), съцветие, цвят, листа, корени, коренов връх, епидермис на корена, перицикъл, апекс, плодник, Polen, прашник, хипокотил, стела, дръжка, протопласт, суспензор на зиготното ембрио, розетка и млади листа (Kuroda *et al.* 2012). Проучванията върху ген *AFB4*, кодиращ друг F-box белтък, показват основната му роля в растежа и развитието на растенията. *afb4* мутантите притежават плейотропен фенотип, характеризиращ се със силно намален растеж на първичния корен, по-къси странични корени, много къс хипокотил, по-голяма дебелина на листа и значително забавяне на времето на цъфтеж (Hu *et al.* 2012).

Получените от нас резултати са в съгласие с публикуваните и потвърждават експресия на изследвания ген в растителни органи и тъкани с активно делящи се клетки, така и на различни стадии от соматичен ембриогенез. Ролята на проучвания *F-box* белтък в растежа и развитието на растенията е потвърдена и при двата моделни вида.

Фенотипна оценка на трансгенни линии с модифицирана експресия на *F-box* при *M.truncatula* и *A.thaliana*.

При свръхекспресиращи трансгенни линии от *M.truncatula* освен разликата в големината на триделните листа от едно растение, специфично отклонение, което е наблюдавано при тези линии е позиционирането на листчетата в триделния лист. Върхното листче или някой от двата странични са разположени под почти прав ъгъл по отношение на листната петура, отклонение, което не се наблюдава при контролата.

Най-честите отклонения наблюдавани при трансгенните линии *M. truncatula* със свръхекспресия на *F-box* (OE) са във формата, размера, назъбеността на листчетата от триделната листна петура, понякога

достигащи до рудиментарност на отделните листчета в сравнение с контролата. В много случаи трихомите са разположени по ръба на листната петура на гъсто и са доста по-малко по листната повърхност. Листата на трансгенните линии с инактивирана експресия при *in vitro* растения *M. truncatula* се характеризират с овална форма на листната петура и вариращо назъбени листа, но почти не се отличават от контролата. Електронно микроскопските анализи показват наличие на единични клетки по-издължени от тези при контролата и линиите със свръхекспресия. И при двата вида линии с модифицирана експресия се наблюдават силно отворени устища.

Проведеното изпитване на трансгенните линии в хидропонна система не показва значителни отклонения спрямо контролата. При свръхекспресиращите линии *M. truncatula* се наблюдава по-слабо развита и рехавя коренова система в сравнение с контролата. Отчетени са отделни, единични грудки по кореновата дължина, като техният брой е съпоставим с този наблюдаван в контролата. Надземната част на трансгенните и контролни линии е съпоставима по размер, като се наблюдава вариране в размера на листата. Кореновата система на растенията с потисната експресия също е по-слабо развита и с по-малко разклонения от тази на контролата. Броят на грудките, разпръснати по дължината на корена, е редуциран. Надземната част на растенията е съпоставима с тази на контролата и не се наблюдават отклонение в формата на листата.

Трансгенните и контролните растения от *A. thaliana* са отгледани *in vitro* за период от 15 дни, след което са пренесени в почва при оранжерийни условия. Свръхекспресиращите растения *At-F-box-OE* се характеризират с разнообразни по-форма и големина листа в розетката с малобройни дълги трихоми. Същите дълги трихоми се наблюдават и по цветоноса, който не е разклонен. Направената фенотипна оценка на цвета, не показва отклонения нито по брой на цветните елементи, нито по форма. При проведените микроскопски наблюдения на обезцветени листа са установени нетипични по размер клетки при линия 5814 и 6017, както и недоразвити двуроги трихоми.

Растенията *At-F-box-amiRNA* с инактивирана експресия на *At-F-box* гена се характеризират с много на брой издължени и почти равни по форма листа в розетката. Цветоноса е дебел покрит с къси трихоми. Не са наблюдавани отклонения в броя и формата на цветните части. Издължената форма на листата в розетката ни провокира да направим микроскопски наблюдения на обезцветени листа. В резултат от проведените наблюдения бяха установени гигантски епидермални клетки по дължина на листата. Най-вероятно издължената форма на листата е резултат от наличието на този вид клетки, които не се наблюдават в контролата и свръхекспресиращите линии. Тези резултати са потвърдени и от проведените флоуцитометрични анализи, които са представени по-долу.

Морфометрични анализи на трансгенни линии с модифицирана експресия *At-F-box OE* и *amiRNA* от *Arabidopsis thaliana*

Направените морфометрични анализи включват измервания на площта на листната петура, брой и размер на епидермалните клетки, ДНК хистограми на листа (флоуцитометрия) при *OE* и *amiRNA* линии от *A. thaliana*.

Извършените морфометрични измервания на листен епидермис от *F-box OE* и *amiRNA* линии са направени с 22 дневни *in vitro* семенни прорастъци, като са взети проби от първа двойка същински листа, единият лист е обезцветен и фиксиран за снемане на параметрите площ на листа, брой и размер на епидермалните клетки, а срещуположният лист от двойката е използван като материал за флоуцитометричен анализ. Този начин на събиране на пробите осигурява максимална достоверност на резултатите получени при двата вида анализи. Снети са параметри от листната петура при лист от първата двойка същински листа и е установено пloidното ниво на клетките в срещуположният лист на същата възраст и етаж. Отчетените резултати показват съпоставима листна площ при *amiRNA* линиите и свръхекспресиращата линия /6017/ и по-голяма, в сравнение с контролата. Големината на епидермалните клетки при една от изследваните *amiRNA* линии /линия 1-1/ превишава незначително тази на свръхекспресиращата линия и контролата и е значително по-голяма от големината при другите две изследвани линии 3-3 и 3-4. Отчетеният среден брой епидермални клетки е незначително по-голям при *amiRNA* линии /линия 1-1/ в сравнение с свръхекспресиращата линия и контролата, а броят епидермални клетки при другите две *amiRNA* линии е значително по-голям от този при линия 1-1, свръхекспресиращата линия и контролата.

Резултатите от измерванията на листната площ, големина на епидермалните клетки и по-малкият брой епидермални клетки установени при линията /1-1/ в сравнение с останалите две линии с инактивирана експресия, кореспондират с големината на листата и гигантските клетки при същата линия в оранжерийни условия описани по-горе.

Паралелно с морфометричните анализи направени с листа на трансгенни линии с модифицирана експресия *AtF-box* OE и RNAi и контрола е проведен и флоуцитометричен анализ за определяне нивата на плоидност в клетки от първите същински листа на 22-дневни *in vitro* растения. В сравнение с контролата, листата от OE линии показват значително по-високи нива на плоидност (4C) на клетките, като е установена достоверна разлика ($p \leq 0.05$). При amiRNAi линиите, нивата на плоидност се характеризират с по-високо процентно съотношение на 8C клетките и на почти двойно по-големия брой на 16C клетките в сравнение с тези на свръхекспресиращите линии и контролата ($p \leq 0.05$), като особено ясно това е изразено при линия 1-1 ($p \leq 0.01$).

Резултатите от проведените морфометрични измервания на клетките от листен епидермис, и флоуцитометричния анализ допускат, че в клетките, на линиите с модифицирана експресия (OE, amiRNA) протича процес на ендоредупликация, което е по-ясно изразено при amiRNA линиите. Подобни резултати оказващи пряк ефект върху броя и големината на епидермалните клетки, както и нивото на плоидност при трансгенни растения с модифицирана експресия от *A.thaliana* са получени и описани в публикуваните от нас резултати (Boyuheva *et al.* 2015), където *MtF-box* е хетероложно експресиран в моделното референтно растение.

Биологичният смисъл на ендоредупликацията е наличието на ДНК репликация без последваща митоза и цитокинеза по време на клетъчния цикъл, в резултат на което се отчита повишено ниво на плоидност (Massonnet *et al.* 2011). Увеличаване на плоидното ниво на клетките без последващо деление е тясно свързано с размера и броя на епидермалните клетки, както и с листната площ. Ключов механизъм на процеса на растителното развитие е точният баланс между клетъчното деление и размер на клетката (Nemerly *et al.* 1995). Контролът на тъканно-специфичния размер на клетките се осъществява по време на клетъчния цикъл (Francis 1998). Когато клетката достигне оптимален размер се иницира процес на клетъчно деление. Вероятно наличието на клетки с високо плоидно ниво в проучваните трансгенни линии е причинено от нарушената функция на изследвания ген кодиращ F-box белтък участващ в SCF комплекса свързан с деградирането на протеините, което повлиява клетъчния цикъл, като не протича митоза и последваща клетъчна диференциация (Ishida *et al.* 2010). На база на получените резултати допускаме, че изследваният от нас ген, кодиращ F-box белтък съставна част от SCF комплекса, може да участва в деградирането на някои от основните гени участници в клетъчния цикъл.

Динамика на нарастване на корен проследена при трансгенни линии с модифицирана експресия от A.thaliana

Нарастването на дължината на главния корен е проведено с петдневни семенни прорастъци, като първоначално е отчетена дължината на първичния корен и нарастването е проследено на 24^{ия}, 48^{ия} и 72^{ия}, 96^{ия} и 120^{ия} час. Отчетената първоначална коренова дължина е най-малка при линиите с инактивирана експресия на гена в сравнение с контролата и свръхекспресиращите линии. Отчетена е статистически достоверна разлика ($p \leq 0.0001$) между изпитаните amiRNA линии /1-1; 3-3; 3-4; 5-4/ и контролата, както и ($p \leq 0.05$) при OE линия 6017 и контролата. Статистически достоверна разлика от ($p \leq 0.05$) за първите 24 часа) в растежа на корена на amiRNA линии и OE линия 5814 в сравнение с контролата се запазва до 48 час ($p \leq 0.001$) и 72-ия час, при който варира от $p \leq 0.05$ до $p \leq 0.001$. Отчетената разлика в нарастването на корена през 96 и 120 час е налична за amiRNA линии 3-4 и 5-4 и OE линии 5717 и 6017 спрямо контролата и варира от ($p \leq 0.05$ до $p \leq 0.005$).

Резултатите от проведеното проучване ни провокираха към провеждане на детайлно микроскопско наблюдение с конфокален микроскоп на 5 дневни първични корени при *A.thaliana* линиите с инактивирана експресия и тези със свръхекспресия сравнени с контолата.

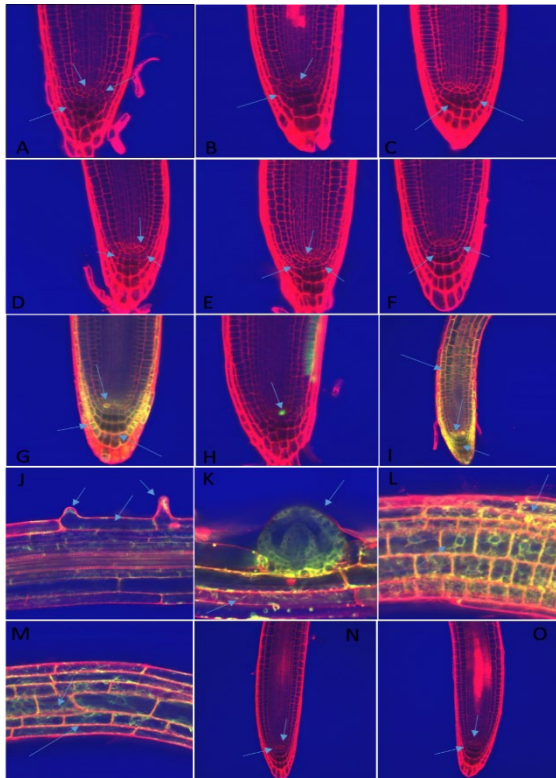
Растежа и развитието на корена при растенията се поддържа от група клетки наречени стволови, които формират нишата от стволови клетки /stem cell niche SCN/ в кореновата апикална меристема и се делят асиметрично. Тези стволови клетки поддържат баланса между клетъчни деления и диференциация и

дават началото на различните тъкани в корена, като по този начин осигуряват непрекъснатия му растеж (Bennett and Scheres, 2010). В центъра на нишата от стволони клетки има от 4 до 8 клетки, които формират, така наречения *quiescent center* (QC) мълчаш център, който е отговорен за съдбата на прилежащите стволони клетки (*distant stem cell*, DSC), (van den Berg *et al.* 1997). Транскрипционните фактори PLETHORA (PLT) и SCARECROW (SCR) участват в QC спецификацията (Aida *et al.* 2004; Sabatini *et al.* 2003), а транскрипционен фактор WOX5 (WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5) експресиращ се в QC отговаря за поддържане на недиференцирано състояние на заобикалящите стволони клетки. QC, намиращ се в центъра на SCN, поддържа неопределеното нарастване на корена, като предотвратява диференциацията на околните стволони клетки. Както ауксинът, така и група от транскрипционни фактори, включително PLTs, SCR и WOX5, са важни за QC спецификацията и активността на стволони клетки.

При линиите с инактивирана експресия /5-4; 1-1; 3-3; 3-4/ най-често наблюдаваните отклонения се характеризират с променлив брой и форма на QC клетки. Тези клетки са /4-8 на брой, най-често 4/ в *Arabidopsis* са с равни размери недиференцирани и са в покой. При amiRNA линиите QC клетките и отдалечените стволони клетки (*distant stem cell*, DSC), са с неправилна форма, в някои случаи хаотично разположени и подложени на множество неорганизиран асиметрични деления (Фиг.21 А,В,С,Д,Е). Микроскопските наблюдения потвърдиха, че в една от свръхекспресиращите линии 5814, GFP сигнала /слят с кодиращата последователност на гена/ е локализиран в една от клетките на QC, а при линия 6017 и в четирите клетки на QC (G,H,I), подобно на описания при *Arabidopsis* WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) транскрипционен фактор. Този транскрипционен фактор специфично се експресираща в клетките от QC и е свързан с установяването на максимален ауксинов градиент, който насочва кореновия растеж, и развитие чрез модулиране на клетъчното делене и нарастване, както и диференциацията на стволоните клетки (Tian *et al.* 2013). Експресията на маркерния ген GFP в свръхекспресиращите линии се наблюдава още и във формиращите се коренови власинки, вторичните корени и нарастването им, в ендоплазматичния ретикулум и пластидите на клетките от преходната зона, разположена непосредствено след меристемната и в зоната на удължаване (Фиг. 21 J,K,L,M). При контролата се наблюдават 4 QC клетки, които са с правилна форма, както и подредба и разпределение на DSC. Най-вероятно наблюдавания по-бавен растеж на първичния корен при изследваните линии с инактивирана експресия, както и по-слабото му нарастване проследено при експеримента динамика на коренов растеж се дължи на нетипичната форма и клетъчна активност на клетките от QC и DSC характеризирани се с хаотични асиметрични деления. При свръхекспресиращите линии клетките от QC и DSC са с правилна форма и подредба, с малки изключения при линия 5717, където се забелязват клетки с разнообразна форма при DSC (Фиг. 21 F). Изненадваща е експресията на маркерния ген в QC клетките, при линии 5814 и 6017. В литературата маркер за експресия в QC клетките е докладваният (WOX5) транскрипционен фактор при *Arabidopsis* (Tian *et al.* 2013). Последните изследвания на de Luis Balanguer и съвт. от 2017, сочат, че освен WOX5, PERIANTHIA (PAN) е друг регулатор на функциите на QC. Подобно на WOX5, PAN контролира поддържането на стволоните клетки на колумелата и деленията на QC. Обратно на WOX5, който ограничаваша клетъчните деления в QC, PAN индуцира деления в QC. Направеният от de Luis Balanguer и съвт. транскриптомен анализ на *Arabidopsis* коренови стволони клетки, идентифицира 1625 гена, 2/3 от които отговорни за процес на убиквитиниране и деградация, както и 201 транскрипционни фактора (de Luis Balanguer *et al.* 2017). В съгласие с тези резултати наблюдаваната експресия на маркерния ген GFP в QC клетките е обяснима. В този аспект проучваният *AtF-box* представлява интерес, но са необходими допълнителни сравнителни изследвания свързани с посочените по-горе гени сляти с различни флуоресцентни маркерни гени, както и наличието на двойни мутантни линии.

Фигура 21. Микроскопски наблюдения с конфокален микроскоп на 5 дневни първични корени от *AtF-box* линии с модифицирана експресия /amiRNA линии - 5-4; 1-1;3-3; 3-4 и OE линии - 5717; 5814; 6017 SALK линия и контрола. Корените на amiRNA, и OE линии, и контролата са маркирани с пропидиев йодид /PI/, а при OE^{тс} линии - 5717; 5814; 6017 маркерния ген GFP е слят с кодиращата последователност. А- amiRNA линия 5-4; В- amiRNA линия 1-1; С amiRNA линия 3-3а; Д- amiRNA

линия 3-4; **Е**- amiRNA линия 3-3-b. Стрелките отбелязват неравни по брой, форма и размери клетки на QC, както и DSC, с хаотични асиметрични деления. **F**- OE линията 5717 стрелките отбелязват асиметрични деления в DSC; **G**- линия 5814, GFP сигнал се наблюдава в една от клетките на QC и колумелата, сигнала е оцветен в жълто/сливане на флуоресцентния сигнал от GFP и PI; **Н**- линия 5814, GFP сигнал се наблюдава в една от клетките на QC, двата флуоресцентни сигнала са филтрирани; **И**- линия 6017 GFP сигнал се наблюдава в четирите клетки на QC, клетки на ендодермиса, кортекса и централния цилиндър /двата флуоресцентни сигнала са сляти, жълтия вят индикира силна флуоресценция/; **Ј**- линия 6017 GFP експресия в формиращите си коренови власинки, силен сигнал във върха на власинките и ендоплазматичния ретикулум; **К**- линия 6017 формиране на вторичен корен GFP експресия е силно изразена в основата на формиращата се коренова примордия и по-слаб сигнал в ендоплазматичния ретикулум и пластидите; **L**- линия 6017 преходна зона /transition zone/ GFP експресия е силно изразена в пластидите и по-слабо в ендоплазматичния ретикулум; **М**- линия 6017 зона на удължаване /elongation zone/ GFP експресия в пластидите и в ендоплазматичния ретикулум; **Н-контрола**; **О**-контрола. Стрелките посочват QC клетките.



Наблюдаваните отклонения в броя и формата на клетките в quiescent center (QC) зоната, неравномерните клетки и хаотичните асиметричните деления на клетките от distal stem cells (DSC) при *A.thaliana* трансгенните линии с модифицирана експресия, както и отклоненията в големината във

формата и назъбеността на листата при трансгенните линии с модифицирана експресия при *M. truncatula* и *A.thaliana* ни провокираха към изследване за връзка на изследвания от нас ген при протичане на клетъчния цикъл при двете моделни растения. Изследванията върху клетъчния цикъл са фокусирани към отговор на въпроса как клетъчното делене се интегрира в процеса на растеж и развитие на растението. Важен аспект в изследванията е познаването на механизмите, които управляват преминаването към митоза и особено предходната фаза от клетъчния цикъл предхождаща митозата G2-контролната фаза. През последните 15 години се натрупаха много знания върху транскрипционния контрол на клетъчния цикъл и по-специално на G2-контролната фаза, но има много неясноти по отношение на посттранскрипционно ниво на регулиране. В тази връзка нашите изследвания са насочени към идентифициране на ролята на изследвания от нас ген кодиращ *F-box* белтък и участието му в клетъчния цикъл. В този аспект изследваният ген от *Medicago truncatula* и неговият хомолог от *Arabidopsis thaliana* не са проучвани преди. Нашите пионерни изследвания, вече публикувани са свързани с локализирането на генната експресия на *Mt-F-box* чрез проследяване експресията на маркерните гени *GUS* и *GFP* в трите моделни растения *M.truncatula*, *L.japonicus* *A. thaliana*. Една от целите ни при проучването на този ген е да определим времето на активиране на експресията му в клетъчния цикъл при контролите и трансгенни линии с модифицирана експресия от *M. truncatula* и *A. thaliana*. Този тип изследвания са свързани с наличието на метод за синхронизиране на кореновата меристема или друг вид активно делещи се клетки при прилагане на инхибитор на репликацията. Такава система вече е разработена при предишни наши изследвания с моделното растение *A. thaliana* (Cools *et al.* 2010). Една от задачите по време на EMBO специализацията на доц. Анелия Янчева е свързана с установяване на система за синхронизиране на клетките от коренова меристема при моделното бобово растение *M. truncatula*. Резултатите от това изследване са публикувани (Iantcheva *et al.* 2015), а системата е успешно използвана за установяване активирането на експресията *Mt-F-box* гена в клетъчния цикъл на моделното растение.

Клетъчният цикъл има две основни фази S фаза, през която се осъществява синтеза на ДНК и M фаза или митоза, през която хромозомите се разпределят по равно в дъщерните клетки. Определени са и две контролни точки G1 и G2 предшестващи съответно S и M фазите. Тези два прехода G1/S и G2/M към основните фази се характеризират като контролни точки/фази за преминаване към делене, диференциация, програмирана клетъчна смърт или покой. Фазите и преходните точки се контролират от серин-треонин кинази, които се активират от регулаторни протеини циклини, затова се наричат циклин зависими кинази (CDKs), контролиращи клетъчния цикъл. Експресионният профил на тези CDKs е постоянен през целият клетъчен цикъл. Периодичната експресия на циклините осигурява специфично синхронизиране на активността на CDKs през фазите. Функционалните изследванията свързани с определяне активността на изследваните гени се базират на наличието на синхронизирани култури. Разработването на система за синхронизиране на коренови връхчета чрез прилагане на ген токсичен агент хидроксурея предоставя възможност да се изследват гени в ендогенно стабилни условия и при унифицирани меристемни клетки. Ефективността на такава система налична при моделното растение *Arabidopsis thaliana* е потвърдена чрез прилагането на съвременни анализи за експресия (Cools *et al.* 2011). В повечето случаи синхронизирането на клетъчните култури се основава на изчерпване на важни хранителни вещества или чрез използването на инхибитори - известни като репликационни инхибитори, като афидиколин или хидроксурея. Прилагането на HU се основава на антипролиферативна и способност, което води до инхибиране на малките субединици на рибонуклеотидредуктазата, ензим, който е отговорен за поддръжката на необходимото количество на нуклеотиди (dNTPs) в делиещите се клетки (Saban and Bujak, 2009). Прилагането на този гентоксичен агент намалява концентрацията от наличните нуклеотиди, необходими за репликацията на ДНК и предизвиква спиране на клетъчния цикъл (Wang and Liu, 2006).

Разработването на система за синхронизиране на коренови връхчета при моделното растение *M. truncatula* изисква извършването на предварителни анализи свързани с установяване на параметри необходими при изготвяне на методиката. Използването на репликационния инхибитор хидроксурея (HU) изисква предварително определяне на доза нетоксична за растенията. За разработването на

система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета при *Medicago truncatula* е определена концентрацията от 1mM HU.

За детайлно проследяване на промените в кинетиката на клетъчния цикъл са направени флоуцитометрични анализи на коренови връхчета от семенни прорастъщи третираны с 1 mM HU за различно време (0; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30 часа). Направеното флоуцитометрично изследване на коренови връхчета от *Medicago truncatula* в условията на третиране с репликационния инхибитор HU, показва, че той се характеризира с продължителна S фаза започваща от 6^h до 14^h и второ навлизане в S фаза след 30^h час. Периода от 14^h до 22^h час от третирането с HU отговаря на прехода G2-M на клетъчния цикъл.

Валидирането на представения модел на клетъчния цикъл от синхронизирани с хидроксиурея коренови връхчета от *Medicago truncatula* е направено с експресионни анализи на специфични маркерни гени от клетъчния цикъл. Експресионните профили на тези гени са определени в следните времеви интервали (0; 4; 6; 10; 14; 18; 22; 26 h).

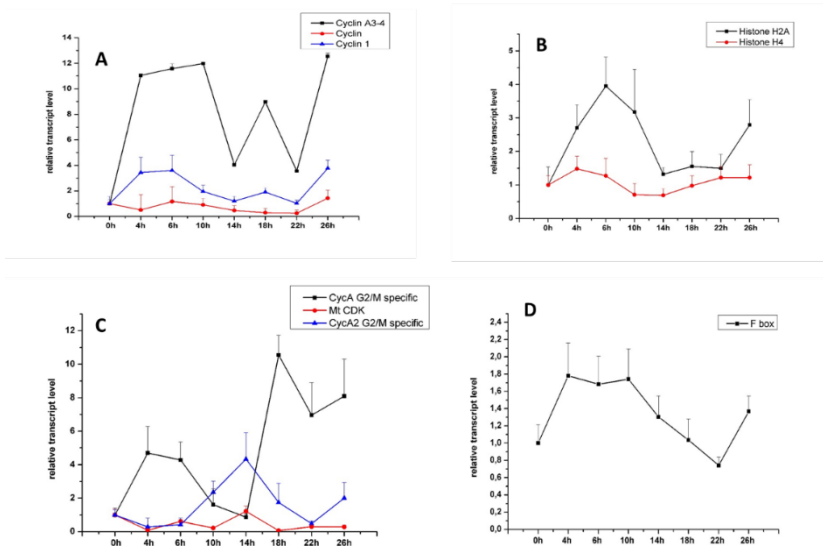
Ортолозите на маркерните гени за клетъчен цикъл от *Arabidopsis* са определени при *Medicago truncatula*, като е използвана базата данни за сравнителна геномика PLAZA 2.5. За валидирането са използвани 6 гена маркери за S фаза и прехода G2/M и техните профили са визуализирани графично. Експресионните нива на маркерните гени за S фазата са представени на фигура 22 А. Транскрипционното ниво на ген *MtCyclinA3-4* се повишава рязко до 4^h час от третирането, като запазва константно ниво между 6^h и 10^h час. Експресията достига своя максимум на 10^h час последвана от спадане на нивото на транскрипта. Вторият пик на експресия, който е типичен за цикличните маркери за S фаза се формира на 18^h час, последван от рязко намаляване и отново се покачва със започването на следващата S фаза на 26^h час. Другият маркерен ген *MtCyclin1* притежава същия профил, но неговото експресионно ниво е доста по-ниско от това на *MtCyclinA3-4*. Промяната на транскрипното ниво е много слабо с изразен пик в 6^h час и друг по-слабо изразен пик на 26^h час при *MtCyclin*. Получените резултати за експресионния профил на подобрения маркерен ген определен като *MtCyclinA3-4* (ортолог в *Arabidopsis* AT5G43080 е *AtCyclinA3;1*) е точен маркер за S фаза при моделното растение *M.truncatula*. Представените профили на *M. truncatula CyclinA3-4* и *MtCyclin1* притежават времеви пикове на експресията подобни на тези получени за маркерните гени за S фаза установени при *Arabidopsis* в изследванията на Cools и съав., (2010). Резултатите получени в изследването за създаване на синхронизирана система от коренови връхчета при *Arabidopsis* потвърждават, че третирането с HU има ефект върху транскрипцията на хистоновите гени. Транскрипционното ниво на два от хистоновите гени (*MtH2A* и *MtH4*) също е проучено по време на клетъчния цикъл. Нивото на транскрипт на *MtH2A* рязко се повишава от 0 до 6 h и образува пик на 6^h час и бавно намалява, като започва да се покачва отново когато клетките започнат да навлизат отново в S фаза от 26^h час (Фигура 22 В). Експресията на другият хистонен ген *MtH4* показва същия експресионен профил, но неговият пик се появява във времева точка 4^h час, два часа по-рано от *MtH2A*, което се наблюдава и при резултатите получени за *Arabidopsis* (Cools *et al.* 2010). На база на получените анализи от флоуцитометрията времеви период от 14^h до 22^h час от третирането отговаря на прехода G2-M на клетъчния цикъл. Експресионните профили на подобрените G2/M маркерни гени са представени на Фигура 22 С. Първият от подобрените G2/M маркерни гени *CyclinA G2/M* специфичен, формира малък експресионен пик на 4^h час последва спад в експресията и отново индуциране на експресията, което достига максимум на 18^h час от третирането с HU, последвано от бавно намаляване до 22^h час и ново нарастване на транскрипта, с навлизането на клетките в нов клетъчен цикъл. Експресионните профили на другите два подобрени гена *MtCyclinA2 G2/M* специфичен и *MtCDK*, показват подобен профил на експресия с пик на 14^h час, последван от бавно намаляване. Резултатите от получените експресионни профили на G2/M подобрените маркерни гени за *M. truncatula* са в съгласие с тези наблюдавани при *Arabidopsis*. Разработената система за синхронизиране на коренови връхчета от *Medicago truncatula*, е използвана за позиционирането и определяне на предполагаемата роля на проучвания *Mt-F-box* ген при протичане на клетъчния цикъл. Експресионният профил на гена се свързва с продължителната S фаза. Нивото на транскрипт се покачва до 4^h час и поддържа почти постоянно ниво до 10^h час и бавно намалява до приключване на G2/M

фазата. Нивото на транскрипт отново се покачва с навлизането на клетъчния цикъл отново в S фаза (Фигура 22 D).

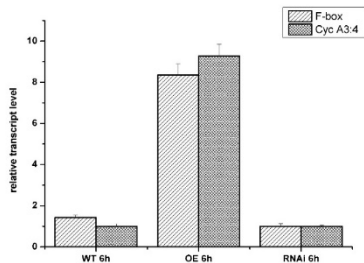
За определяне предполагаемата роля на *Mt-F-box* в клетъчния цикъл проведохме експеримент базиран на потомството на трансгенните линии с модифицирана експресия. Експресионният профил на *Mt-F-box* е определен чрез синхронизиране на коренови връхчета от трансгенни линии със свръхекспресия с инактивирана експресия и контрола WT див тип. Два времеви интервала 6^{ти} и 18^{ти} час отговарящи съответно на, началото на S фазата и G2/M контролната точка са подбрани за определяне на експресионния профил на изследвания ген *Mt-F-box*. Нивото на транскрипт на *Mt-F-box* във времеви интервал 6^{ти} час достига максимум на индукция при OE линия, следван от контролата и е най-ниско при RNAi линията. Във времевата точка 18^{ти} час нивото на транскрипт при OE линия е два пъти по-ниско, леко намалено при контролата и остава същото при RNAi линията. Експресионният профил на *Mt-F-box* в коренови връхчета събрани от микрорезници от трансгенните и диви тип растения се характеризира със същия профил, като този установен при див тип синхронизирани коренови връхчета от семенни прорастъци.

Транскрипционният профил на определеният маркерен ген за S фаза *MtCyclinA3-4* е установен също при синхронизирани коренови връхчета от *M. truncatula* OE и RNAi линии. Експресионното ниво на маркера за S фаза *MtCyclinA3-4* е съпоставимо с това *Mt-F-box* при трансгенни линии с модифицирана експресия (OE, RNAi) и див тип растения. (Фигура 23). Повечето от публикувани в литературата данни утвърждават два E3 убиквитин-лигазни комплекса (SCF и Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C)комплекс), които са отговорни за деградирането на протеините по време на клетъчния цикъл и се свързват с G1/S и G2/M преходите (Maggoco *et al.* 2010). Изследваният ген *Mt-F-box*, е част от SCF комплекса. На основа на проведените анализи допускаме, че функцията му в клетъчния цикъл е свързана с деградиране на прицелни протеини от клетъчния цикъл по време на G1/S фазата.

Фигура 22. Валидиране на модела на клетъчния цикъл при *M. truncatula* чрез експресионни анализи

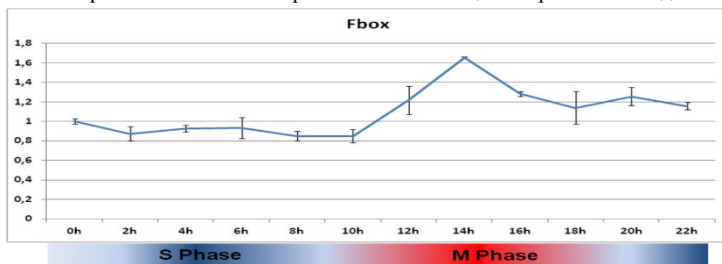


Фигура 23. Нива на транскрипти на *Mt-F-box* и *MtCyclinA3-4* в меристемни клетки от синхронизирани коренови връхчетата за 6 часа при трансгенни растения с модифицирана експресия и контрола. На база на разработената при моделното растение *A.thaliana* система за синхронизиране на коренови връхчета в предишни изследвания (Cools *et al.* 2010) е определено активирането на *At-F-box* гена по



време на клетъчния цикъл при *A.thaliana* див тип растения. Изследваният ген *At-F-box* ортолог на *Mt-F-box* показва максимално ниво на експресия в прехода към митоза или по-точно в контролната точка G2/M. До момента на приключване на S фазата експресията на гена е почти постоянна (10th час), след което се активира и отбелязва пик в 14th час. За разлика от *Mt-F-box* гена, при който определихме почти постоянна и най-висока експресия (от 6th до 10th час) по време на продължителната S фаза то достигането на максимална експресия на гена от *A.thaliana* се отличава с много по-къс период на действие Фигура 24.

Фигура 24. Експресия на *At-F-box* по време на клетъчния цикъл при *A.thaliana* див тип.

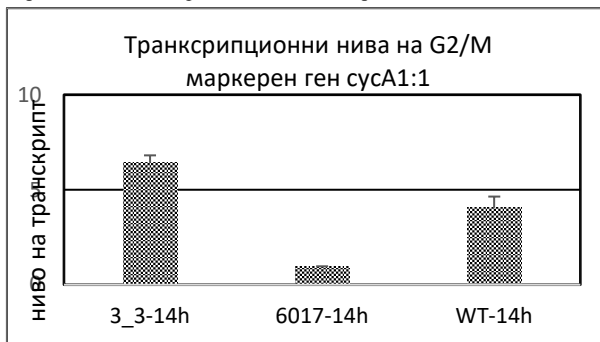


Активирането на експресията на *At-F-box* гена е свързано с G2/M прехода от клетъчния цикъл. Като съставна част от SCF комплекса най-вероятно е ролята на изследваният ген да е свързана с деградирането на протеините участващи в клетъчния цикъл. При *A.thaliana* G2/M прехода е много добре проучен по отношение на ключовите гени, както и техните транскрипти. Циклин зависимите кинази CDKB1:1, CDKB2:1 и циклинните CysA1:1, CysA2:1, CysB1:1 е доказано, че имат максимум на експресия по време на прехода към митоза дори пика на техните транскрипти се свързва с 14th час от третиране с HU. За целта на експеримента е избран циклин *CysA1:1*, който е изключително специфичен за прехода G2/M. Коренови връхчета от *A.thaliana* трансгенните линии с модифицирана експресия 6017OE и amiRNA3-3, както и от контролни растения WT, са синхронизирани с 1 mM HU за период от 14 часа.

Транскрипционните нива на селектирания маркерен ген при изследваните линии и контролата са определени чрез qRT-PCR. Нивото на транскрипт на подобрения маркерен ген CysA1:1 е най-високо при amiRNA3-3 линии (Фиг. 25). При линия 6017OE отчетеното ниво на транскрипт е доста

по-ниско дори сравнено с това при контролата. Резултатите от експеримента ни позволяват да допуснем, че изследваният F-box белтък, участва в деградирането на протеините, /като част от структурата на SCF комплекса/, които са специфични за прехода G2/M. Според базата данни Atted II ver. 9.2, списъка от гени, които се ко-експресират с проучвания At1g10780, CusA1;1 /At1g44110/ директно се свързва с изследвания F-box белтък. Нивото на корелация на експресията базирано на резултати от Микроарей е много сходно при тези два гена /<http://atted.jp/>. Най-вероятно F-box белтъка директно се свързва с CusA1;1 и участва в неговото деградиране по време на G2/M прехода. Поради тази причина отчетеното ниво на CusA1;1 транскрипт в линията с подтисната експресия 3-3 е най-високо, последвано от контролата и най-ниско при линия 6017 свръхекспресираща At-F-box.

Фигура 25. Транскрипционни нива на G2/M маркерен ген *cusA1:1* в трансгенни линии с модифицирана експресия от *Arabidopsis thaliana* и контрола.



По-подробното изясняване на функциите на изследвания F-box белтък при *M.truncatula* и *A.thaliana*, свързано с активирането му по време на клетъчния цикъл, експресията му в почти във всички растителни органи и тъкани по време на растежа и развитието на растенията изисква допълнителни анализи на белтъчно ниво. За да отговорим на част от тези въпроси са направени експерименти базирани на разработения метод Тандемно афинитетно пречистване (TAP) и при двете моделни растения. Този метод се характеризира с афинитетно пречистване на протеините или протеиновите комплекси и мас спектрално им определяне (AP-MS) (Wodak *et al.* 2009; Pflieger *et al.* 2011; Braun *et al.* 2013). За провеждането на експеримента се подготвят конструкции, които представляват транслационни сливания на протеина представляващ интерес „стръв“ и двойно афинитетен таг, които се внасят в растенията чрез генетична трансформация, от получените трансгенни растения се изолира тотален протеин, а чрез последваща двойно-афинитетна процедура на пречистване се отделят протеиновите комплекси и се определят чрез използването на високо-чувствителна мас-спектрална детекция на ниво белтък (Li 2011). Този метод предоставя информация за белтъчните взаимодействия и дава по-пълна представа за функциите на изследвания ген.

Изолирането на протеинови комплекси чрез TAP анализ при *M.truncatula* е основано на продуцирането на трансгенни корени “hairy roots”, а при *A.thaliana* на трансформирани суспендиални култури. Резултатите от проведеня TAP (Tandem Affinity Purification) анализ при *M.truncatula* идентифицират директни и индиректни функционални взаимодействия на F-box белтък, кодиран от проучвания ген. Установени са 4 директни и 10 предполагаеми интерактора на изследвания F-box белтък. Според получените резултати един от директните интерактори на F-box белтъка е SKP1 белтък. SKP1, както и F-box белтъка са ключови единици, които формират SCF-комплекса, отговорен за убиквитинирането на белтъци (Kuroda *et al.* 2002), като по този начин се включват в процеса на селективно деградиране. Последващите ни изследвания са насочени към един от основните интерактори на F-box белтък, идентифициран като ген кодиращ 2-изопропилмалат синтаза (2-isopropylmalate synthase, IPMS, Medtr1g116500.1). В литературата наличните данни, определят gena,

като кодиращ ензим изопропилмалат синтаза, който участва в стъпка при биосинтезата на разклонената аминокиселина левцин (de Kraker *et al.* 2007). Аминокиселината левцин е една от трите разклонени аминокиселини- валин (val), левцин (leu), изолевцин (isoleu). Специфичното за тези аминокиселини е, че се синтезират само от растенията. В растителните организми синтеза и деградиратето им са в строг баланс, а нарушаването му предизвиква изменения в растежа и развитието на растенията.

Резултатите от ТАР анализа, както и наличната литература предполагат провеждането на транскрипционен анализ на *IPMS* гена при T_1 трансгенни линии *om M. truncatula* с модифицирана експресия (*MtF-box* OE и RNAi) и контрола. Изследваният *MtF-box* ген кодиращ *F-box* белтък е съставна част от SCF комплекса и участва в селективно деградиране на прицелния ензим изопропилмалат синтаза, което намалява неговата активност и води до намаляване на нивото на *IPMS* транскрипти. При *MtF-box* OE линии, нивото на *IPMS* транскрипти е по-ниско, а при линиите с инактивирана експресия на гена е отчетено леко повишено съдържание на *IPMS* транскрипти. Подобна корелация на ензимна активност и транскрипт е докладвано в изследванието на Kuntz *et al.* 1992 и Yin *et al.* 2017, както и установено в наши изследвания за ген *HAC1* кодиращ хистон ацетилтрансфера (Boysheva *et al.* 2017).

Установените разлики в нивото на транскрипт при линиите с модифицирана експресия предполага и различия в нивото на синтезиран левцин. Логично е допускането, че в свръхекспресиращите линии се очакват по-ниски концентрации на левцин, а при линиите с инактивирана експресия по-високи. Недостига на аминокиселината левцин при свръхекспресиращите линии вероятно е причина за отчетените морфологични изменения в листата наблюдавани при тези трансгенни линии. Нивото на *F-box* транскрипти при MtRNAi линии е по-ниско, което води до по-високи нива на *IPMS* транскрипти, и вероятно до повишаване на количеството на левцин.

За да потвърдим достоверността на резултатите от ТАР анализа и направения анализ на ниво траскрип за *MtIPMS* гена, логична следваща стъпка в изследванията ни е определяне съдържанието на свободни аминокиселини при *Medicago truncatula* трансгенни линии с модифицирана експресия и контрола.

Съдържанието на свободни аминокиселини leu, isoleu и val е определено чрез GC/MS (газова хроматография/мас-спектрометрия) анализ в растения от *M. truncatula* с модифицирана експресия на *MtF-box* и див тип контрола. Получените резултати потвърждават наличието на по-ниски нива на трите аминокиселини при свръхекспресиращите линии и по-високи при линиите с инактивирана експресия (Таблица 6). Концентрацията на разклонените аминокиселини val, leu и isoleu в линии *M. truncatula* с модифицирана експресия на *MtF-box* и контрола е отчетено за всяка проба и изразено в $\mu\text{g/g FW}$. Получените данни достоверно доказват ниско съдържание и на трите аминокиселини - val ($p \leq 0.01$), leu ($p \leq 0.001$) и isoleu ($p \leq 0.001$) при линиите със свръхекспресия, и значително по-високо при линиите с инактивирана експресия ($p \leq 0.001$), както и в сравнение с контролата (Таблица 6). Получените резултати за определяне на количеството на разклонени аминокиселини потвърждават резултатите от проведения ТАР анализ и определения транскриптомен профил на *MtIPMS* гена и доказват функцията на изследвания ген кодиращ *MtF-box* белтък в синтеза на разклонени аминокиселини.

Таблица 6. Съдържание на валин, левцин и изолевцин ($\mu\text{g/g FW}$) в *M. truncatula* трансгенни линии с модифицирана експресия и контрола.

	L-валин, $\mu\text{g/g FW}$		L-левцин, $\mu\text{g/g FW}$		L-изолевцин, $\mu\text{g/g FW}$	
	средни стойности	$\pm\text{SD}$	средни стойности	$\pm\text{SD}$	средни стойности	$\pm\text{SD}$
OE	32.83	± 1.89	56.30	± 5.29	28.77	± 4.27
RNAi	61.36	± 6.16	293.73	± 19.18	72.80	± 5.00
WT	33.25	± 1.39	202.21	± 15.44	64.66	± 4.75

Резултатите от проведения TAP (Tandem Affinity Purification) анализ при *A.thaliana* идентифицират 1 директен интерактор взаимодействащ с AtF-box белтък, кодиран от проучвания ген. Установен е един предполагаем интерактор на изследвания F-box белтък.

Според получените резултати индиректен интерактор на F-box белтъка е SKP1 белтък. По-горе е отбелязано, че SKP1 и F-box белтъка са единици, които формират SCF-комплекса, отговорен за убиквитинирането на белтъци (Kuroda *et al.* 2002) и така се включват в процеса на селективно деградиране на прицелните белтъци.

Както при Mt-F-box белтъка и при *A.thaliana* единствения установен директен интерактор е определен, като 2-изопропилмалат синтаза (2-isopropylmalate synthase, *IPMS*, AT1G74040.1), а последващите изследвания са насочени към този единствен интеректор на AtF-box белтък.

Аналогично на изследванията при *M. truncatula* е проведен транскрипционен анализ на *IPMS* гена при трансгенни линии от *A.thaliana* с модифицирана експресия (AtF-box OE и amiRNA) и контрола. Нивата на транскрипти са изследвани по-отделно в корени и листа при трансгенните линии и контролата поради много силно изразената експресия на маркерния ген *GFP* проследена и в двата растителни органа. При AtF-box OE линия 6017, нивото на *IPMS* транскрипти е по-ниско и в корени и в листа, което предполага, че изследвания от нас ген кодиращ AtF-box протеин участва директно в деградацията на прицелния ензим изопропилмалат синтаза, което води и до намаляване на нивото на *IPMS* транскрипти. Както бе посочено по-горе съществува корелация между ензимната активност и нивото на транскрипт. Деградирането на ензима изопропилмалат синтаза води и до намаляване на нивото на *IPMS* транскрипти. При линиите с инактивирана експресия на гена е отчетено леко повишено съдържание на *IPMS* транскрипти, спрямо AtF-box OE линията, както в корени, така и в листа.

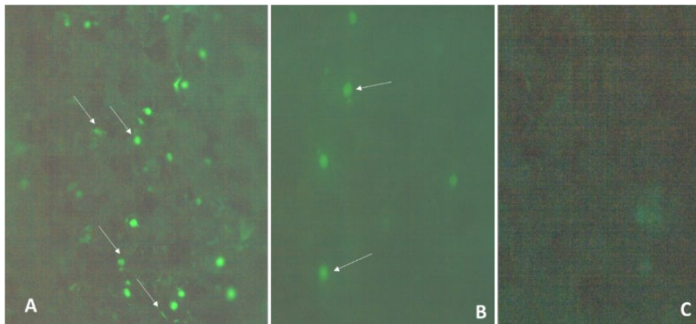
За да потвърдим достоверността на резултатите от TAP анализа и направения анализ на ниво траскрип за AtIPMS гена, логична следваща стъпка в изследванията ни е провеждане на анализ, който показва взаимодействието на гена кодиращ AtF-box белтък и гена AtIPMS кодиращ ензима изопропилмалат синтаза, за доказване на протеин-протеин взаимодействие.

След пълното геномно секвениране на различни растителни видове, както и напредък към дешифриране на цели протеоми, необходимостта от надежден начин за идентифициране на протеин-протеин взаимодействия става важна задача в растителните изследвания. Бимолекулното флуоресцентно допълване (BiFC) е анализ основан на неинвазивна флуоресцентна техника, която позволява откриване на белтъчни взаимодействия в живи клетки, както и може да бъде използвана за определяне на суб-клетъчната локализация на взаимодействащите протеини. BiFC анализът се основава на реконструиране на разделени нефлуоресцентни варианти на GFP, или жълт флуоресцентен протеин (YFP), до образуване на флуоресцентен флуорофор (Ghosh *et al.* 2000; Hu *et al.* 2002). Метода BiFC е прилаган и при визуализиране на взаимодействията белтък-белтък в субклетъчни структури, като ендоплазматичен ретикулум (Zamyatnin *et al.* 2006), хлоропласти (Caplan *et al.* 2008), вакуолата (Voelker *et al.* 2006), ядрото (Stolpe *et al.* 2005) при редица растителни видове, като тютюн (Zamyatnin *et al.* 2006), магданоз (Stolpe *et al.* 2005) и *Arabidopsis* (Voelker *et al.* 2006) в различни тъкани и типове клетки- интактни листа, епидермални слоеве, семеначета и протопласти са използвани при този анализ.

Проведена е трансформация инфилтрация на листа от оранжерийни растения от *Nicotiana bentamiana*, като са използвани различни комбинации на вектори и към всяка от комбинациите е добавен спомагателен вектор p19 за генетична трансформация и ацетосирингон за увеличаване ефективността от агро-инфилтрацията. Наблюдаван е реконструиран сигнал за зелена флуоресценция в ядрата на епидермалните клетки при използваната комбинация на конструктите при 35S::cF-box-stop::heGFP+35S::cIPMS-stop::teGFP. Установеното взаимодействие на двата белтъка, успешно възстановява разделените не-флуоресциращи фрагменти на GFP белтъка до активен флуоресциращ протеин, с изразена ядрена локализация. Резултатите от проведения BiFC анализ са отразени на фигура 26 и са в потвърждение на резултатите от проведения TAP и транскриптомен анализ. Проведените експерименти базирани на трите метода /TAP, транскриптомен профил и BiFC/ доказват

участието на изследвания ген кодиращ *AtF-box* белтък в метаболитни процеси /синтез на разклонени АК/ в моделното растение *A.thaliana*.

Фигура 26. Взаимодействие на *AtF-box* и *AtPMS* при Агро-инфилтрация на листа от *Nicotiana bentamiana*. **А**-наличие на белтък:белтък взаимодействие, стрелките индикират изразена ядрена и по-слаба цитоплазмена локализация на взаимодействащите си протеини; **В**-положителна контрола с ядрена локализация на GFP сигнала; **С**-отрицателна контрола липса на сигнал. Наблюденията са направени с обектив 10X.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследователската работа представена в рамките на настоящия дисертационния труд отразява натрупването и надграждането на знания получени при изследване на род *Medicago*, моделното растение за сем. Бобови *M. truncatula*, както и включените в хода на експерименталната работа още два моделни вида – второто моделно растение на сем. Бобови - *Lotus japonicus* и моделно растение за растителната биология - *Arabidopsis thaliana*. Първоначално получените ключови резултати и акумулираното знание в областта растителната регенерация чрез директен и индиректен соматичен ембриогенез в течна и твърда хранителна среда, стават основа за разработването на ефективни и оригинални протоколи за генетична трансформация при моделните бобови растения.

Разработените протоколи за клетъчни суспендиални култури при *M.falcata* и *M.truncatula* са от съществена значимост при изучаване на ранните събития – първо асиметрично клетъчно делене, индуциране на ембриогенен потенциал и соматични ембриониди произхождащи от единични клетки. Тези системи са перфектен инструмент за проследяване на процеса на растително развитие от една клетка до цяло растение. Развитието на съвременната растителна наука и наличието на подобни системи за клетъчен соматичен ембриогенез позволява определянето на ключови гени и проследяване на експресията им в динамика през целия процес на растително развитие. Още повече наличието на регенерация от клетъчни суспендиални култури предполага разработването на системи за генен пренос и произход на трансгенните растения от единични трансформирани клетки.

Натрупаните оригинални резултати в областта на растителната регенерация и генетична трансформация при моделното бобово растение създават предпоставка за инициране на изследвания по инсерционен мутагенез чрез ретротранспозона *Tnt1* и създаване на колекция от мутантни линии при *M.truncatula*, характеризиращи се с ефективна транспозиция на ретроелемента и многобройни нови включения в генома на моделното растение. В хода на експерименталната работа по инсерционен мутагенез в партньорство с изследователската група на Проф. Паскал Рате е идентифициран и проучен ретроелемента *MERE1*, който също се транспозира по време на *in vitro* регенерация и индуцира допълнителни включения в генома на мутантните линии. Създадените инсерционни мутантни линии са ценен експериментален материал, както за идентифициране на ключови гени от растителното развитие и проучване ролята им във функционирането на целия растителен организъм.

Следващата надграждаща стъпка в изследователската работа е инициране на изследвания по функционална геномика при бобови. Създадената мутантна колекция от *Medicago truncatula*, става основа за стартиране на проучвания по функционална и сравнителна геномика на моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, чрез прилагане на методите на права и обратна генетика в рамките на проект, на който екипът от група Функционална генетика Бобови, е координатор.

Натрупаните резултати и експериментален опит при разработване на колекцията от инсерционни мутантни линии при *Medicago truncatula* стават основа за разработване на система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно растение на сем. бобови - *Lotus japonicus* и създаване на малка колекция от инсерционни мутантни линии. Разработената система за инсерционен мутагенез при второто моделно растение би способствала изследванията по сравнителна геномика, както и допълва съществуващата стратегия за създаване на мутантни линии при *Lotus japonicus* основана на ендогенния ретротранспозон *LORE1*.

От създадената колекция инсерционни мутантни линии на АБИ са подбрани секвенирани линии с включвания в ключови гени отговорни за растителното развитие, процеса на азотфиксация и вторично коренообразуване, както и участващи в сигналните каскади и растителната защита. Тези гени са клонирани и прехвърлени в генома на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*, с цел проучване на функцията им. С помощта на вече разработените протоколи по генен пренос са конструирани стабилни трансгенни растения със свръхекспресия, потисната експресия и анализ на промоторната активност на селектираните гени при трите моделни вида, които подпомагат експериментите по функционален анализ. За шест от изследваните гени за първи път е доказано участието им в различни стадии на процеса на индиректен соматичен ембриогенез при *M. truncatula* след проследяване на експресията на маркерния ген *GUS* под контрола на ендогенните им промотори.

В дисертационен труд е представено детайлно сравнително проучване по функционална геномика за ген кодиращ F-box белтък от генома на моделното бобово растение *Medicago truncatula* и моделното растение *Arabidopsis thaliana*. Получените резултати натрупани от изследвания на фенотипа, морфометрията на листни клетки, динамиката на нарастване на корена, при трансгенни растения с модифицирана експресия и контроли и локализиране на експресията на маркерните гени *GUS* и *GFP* свързват изследвания ген с активно делиещи се тъкани и органи при *M. truncatula* и *A. thaliana*, и потвърждават участието му в растежа и растителното развитие.

В хода на експерименталната работа е определена е максималната активност на гена кодиращ F-box белтък при протичане на клетъчния цикъл в моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana*, което предполага участието му в деградирането на ключови протеини от клетъчния цикъл. В резултат от проведения ТАР анализ е излъчен общ директен интерактор на гена и при двете моделни растения, който установява участието му в метаболитен път за синтез на разклонената аминокиселина левцин. При *M. truncatula* тази функция на гена е потвърдена чрез определяне на количествата на свободните разклонени АК в трансгенни растения с модифицирана експресия и контрола. При референтното растение *A. thaliana* участието на гена кодиращ F-box белтък в синтеза на левцин е потвърдено с провеждането на анализ за бимолекулно флуоресцентно допълване.

Резултатите по сравнителното функционално изследване на гена кодиращ F-box белтък от моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana* определят специфичната му функция в синтеза на разклонената аминокиселина левцин, както и ролята му в растителния клетъчен цикъл.

Фундаменталните открития в биологията се основават на, моделните растителни видове, а информацията натрупана при тези видове може да бъде пренесена при културните растения с икономическо значение. Знанието, придобито от моделното растение *M. truncatula* може да бъде прехвърлено към близкородствени бобови - люцерна и детелина, дори, когато се касае до агрономически характеристики добив, особености на растежа, което е потвърдено при функционални анализи на гена STAY-GREEN, и резултатите от моделното растение са пренесени за подобряването на фуражната култура люцерна. Натрупаните знания при моделните растения са източник за подобряване на селскостопански култури

ИЗВОДИ

Обобщаването на резултатите представени в настоящата дисертация, получени в процеса на експерименталната работа, позволява да бъдат направени следните по-важни изводи:

1. Чрез използване на течни суспендиални култури от *M. truncatula* и *M. falcata* е доказана асиметрията на първото клетъчно делене, което стартира процеса на директен соматичен ембриогенез и е проследено развитието му от клетка до цяло растение.
2. Установен е размера на генома на диплоидни видове от род *Medicago* с произход от Алжир и е доказана връзката между размера на генома и компетентността за индуциране на директен соматичен ембриогенез в течна среда.
3. Постигнат е ефективен инсерционен мутагенез чрез *Tnt1* ретротранспозон и е създадена колекция от мутантни линии при *M. truncatula* cv. Jemalong при използването на два нови регенерационни протокола и метод за осмотично претретиране.
4. Разработена е система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно растение на сем. бобови - *Lotus japonicus* на основа на експерименталния опит от *M. truncatula*.
5. Идентифициран е нов ретроелемент *MERE1-I* и е доказана транспозицията му в генома на мутантни линии от *M. truncatula* по време на *in vitro* регенерация.
6. Доказана е ролята на *Tnt1*, като ефективен мутаген в генома на моделното растение *M. truncatula* при фенотипиране на подобрени инсерционни мутантни линии отглеждани в различни условия - *in vitro*, *in vivo*, аеропонна и хидропонна култура.
7. Създадени са вектори за свръхекспресия, потискане на експресията и анализ на промоторната активност на изследваните гени, както и конструкти за TAP и BiFC анализи при моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana*.
8. Доказано е участието на изследваните гени *MtLAX3*; *MtARFB3*; *MtF-box*; *MtHAC*; *MtGRAS*; *MtDRP* в различни стадии на процеса на индиректен соматичен ембриогенез при *M. truncatula* след проследяване на експресията на маркерния ген *GUS* под контрола на ендогенни промотори.
9. Получени са хомозиготни трансгенни растения със свръхекспресия и потисната експресия на изследвания ген кодиращ F-box белтък при моделното растение *A. thaliana*.
10. Проследена е активността на маркерните гени *GUS* и *GFP* и е локализирана експресията на изследвания ген кодиращ F-box белтък в растителни тъкани и органи на трансгенни растения от *M. truncatula* и *A. thaliana*.
11. Свръхекспресията на *F-box* в *M. truncatula* води до видими отклонения във формата на листата, по-къса и по-слабо развита коренова система с единични грудки, а трансгенните *F-box* растения с потисната експресия се характеризират с морфология близка до контролата.
12. Хомозиготни растения от *A. thaliana* със свръхекспресия на *F-box* се отличават с разнообразни по форма и големина листа, както и доминиране на 4С клетки в листата, а тези с потисната експресия формират силно издължени листа, които се характеризират с 8С и 16С клетки в листата сравнени със свръхекспресиращите растения и контролата.
13. Определена е максималната активност на изследвания ген кодиращ F-box белтък при протичане на клетъчния цикъл в моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana*, което предполага участието му в деградирането на ключови протеини от клетъчния цикъл.
14. В резултат от проведения TAP анализ е излъчен общ директен интерактор на гена кодиращ F-box белтък и е определен експресионният му профил в трансгенни растения с модифицирана експресия и контроли при двете моделни растения - *M. truncatula* и *A. thaliana*.
15. Установените количества на свободните разклонени АК в трансгенни растения с модифицирана експресия и контрола при *M. truncatula* валидират резултатите от проведения TAP анализ и определят транскриптомен профил на директния интерактор на F-box белтъка.
16. Установяването на сигнал за зелена флуоресценция след *Agro*-инфилтрация на листа от *Nicotiana benthamiana* валидира резултатите от проведения TAP анализ и определя транскриптомен профил на директния интерактор на F-box белтъка от *A. thaliana*.

ПРИНОСИ

I. ПРИНОСИ С ФУНДАМЕНТАЛНА НАУЧНА СТОЙНОСТ

1. При процеса на ДСЕ в течна среда на моделни клетъчни суспендиални култури от *M.truncatula* и *M.falcata* е доказана асиметрията на първото клетъчно делене, индуцирането на ембриогенен потенциал и развитието на процеса от клетка до цяло растение.
2. За първи път е изследван размера на генома на диплоидни видове от род *Medicago* с произход от Алжир и е установена връзката между размера на генома и компетентността за индуциране на ДСЕ в течна среда.
3. Създадена е колекция от *Tnt1* инсерционни мутантни линии при *M.truncatula* cv. Jemalong чрез протоколи за ефективна транспозиция.
4. Разработена е малка колекция от *Tnt1* инсерционни мутантни линии при второто моделно растение на сем. бобови - *Lotus japonicus*.
5. За първи път е установен нов ретроелемент *MERE1-1* в генома на мутантни линии от *M.truncatula*, който се транспозира по време на *in vitro* регенерация.
6. Открита е оригинална инсерционна мутантна линия, която е наречена „Рибена кост“ след фенотипно охарактеризиране, а *Tnt1* и *MERE1-1* инсъртите и са секвенирани.
7. За първи път е направено сравнително функционално изследване на ген кодиращ F-box белтък в моделните растения *M.truncatula* и *A.thaliana* включващо фенотипни, морфометрични, транскриптомни, протеомни и метаболомни анализи.

II. ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖНА СТОЙНОСТ

1. Създаден е ефективен протокол за генетична трансформация на клетъчни суспендиални култури от *M. truncatula*, при който се регенерират стабилни трансгенни растения от единични клетки и създават възможност за анализи на клетъчно и субклетъчно ниво.
2. Разработена е система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета подпомагаща изследвания на клетъчния цикъл при моделното растение *M.truncatula*.

Списък на публикациите включени в дисертационния труд

1. **Iantcheva A, Vlahova M, Atanassov A (2006a)**. Somatic embryogenesis in genera *Medicago*: an overview. In: Mujib A, Samaj J (eds). Somatic embryogenesis. Plant Cell Monographs, vol 2. Springer, Berlin, pp 285–304.
2. **Iantcheva A, Vlahova M, Atanassov A (2008)**. Somatic embryogenesis from leaf explants of *Medicago truncatula* cv. Jemalong genotype 2HA In: Mathesius U, Journet EP, Sumner LW (ed). The *Medicago truncatula* handbook. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>.
3. **Iantcheva A, Chabaud M, Cosson V, Barascud M, Schutz B, Primard-Brisset C, Durand P, Barker DG, Vlahova M, Ratet P (2009a)**. Osmotic shock improves Tnt1 transposition frequency in *Medicago truncatula* cv Jemalong during in vitro regeneration, **Plant Cell Reports**, vol 28, pp. 1563-1572.
4. Rakocevic A, Mondy S, Tirichine L, Cosson V, Brocard L, **Iantcheva A**, Cayrel A, Devier B., Abu El-Heba GA, Ratet P (2009). MERE1, a low copy number copia type retroelement in *Medicago truncatula* active during tissue culture. **Plant Physiology**, vol. 151, pp. 1250-1263.
5. Vassileva V, Zehirov G, Ugrinova M, **Iantcheva A (2010)**. Variable leaf epidermal morphology in Tnt1 insertional mutants of the model legume *Medicago truncatula*. **Biotechnology & Biotech Eq.** vol. 24/4, 2060-2065.
6. Revalska M, Vassileva V, Goormachtig S, Van Hautegeem T, Ratet P, **Iantcheva A (2011)**. Recent Progress in Development of Tnt1 Functional Genomics Platform for *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* in Bulgaria. **Current genomics**, 12, 147-152.
7. **Iantcheva A, Mysore K, Ratet P (2013)**. Transformation of leguminous plants to study symbiotic interactions. **International Journal Developmental Biology** 57:577-586.
8. **Iantcheva A, Revalska M, Zehirov G, Vassileva V (2014)**. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Medicago truncatula* cell suspension culture provides a system for functional analysis. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, DOI 10.1007/s11627-013-9554-4, 50(2), pp. 149-157.
9. Boycheva I, Vassileva V, Revalska M, Zehirov G, **Iantcheva A (2015)**. Cyclin-like F-box protein plays a role in growth and development of the three model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, and *Arabidopsis thaliana*. **Research and Report in Biology**. vol 6:117-130, DOI <http://dx.doi.org/10.2147/RRB.S84753>
10. **Iantcheva A, Boycheva I, Revalska M (2015)**. Development of root tips synchronized system for the model legume *Medicago truncatula* upon replication stress. **BJAS**. 21(6): 1177-1184.
11. **Iantcheva A, Revalska M, Zehirov G, Boycheva I, Magne K, Radkova M, Ratet P, Vassileva V (2016)**. *Tnt1* retrotransposon as a tool for developing an insertional mutant collection of *Lotus japonicus*. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, **52(3)**, 338-347. DOI: 10.1007/s11627-016-9768-3
12. Fyad-Lameche FZ, **Iantcheva A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC (2016)**. Chromosome number, genome size, seed storage protein profile and competence for direct somatic embryo formation in Algerian annual *Medicago* species. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. vol 124(3) pp 531-540. DOI 10.1007/s11240-015-0912-2.
13. **Iantcheva A, Revalska M (2018)**. Early events during the induction of somatic embryogenesis in genera *Medicago*. **BJAS**, vol. 6:1042-1052.