



Информация за изпълнение на етап на проект

Наименование на конкурса:
Конкурс за финансиране на научни изследвания - 2017 г.
Основна научна област:
Селскостопански науки
№ на договор:
ДН 16/9 от 12.12.2017
Начална и крайна дата на проекта:
12.12.2017 до 12.12.2020
Заглавие на проекта:
Функционални и биоинформатични анализи на GRAS транскрипционни фактори, свързани с отговора към абиотичен и биотичен стрес при едногодишна (<i>Medicago truncatula</i>) и многогодишна (<i>Medicago sativa</i>) люцерна
Базова организация:
Агробиоинститут
Партньорски организации:
Софийски Университет "Св. Климент Охридски", Факултет по математика и информатика
Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):
Гл. ас. д-р Миглена Николова Ревалска
Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:
60 000 лв
Интернет страница на проекта (ако има такава):
-
Научни публикации по проекта:
Revalska, M; Radkova, M; Zagorchev L; Iantcheva, I. (2019) Functional GUS assay of GRAS transcription factor from <i>Medicago truncatula</i> , accepted for publication in <i>Biotechnology & Biotechnological Equipment</i> ID: TBEQ-2019-0165



Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):

Комбинирането на знания от различни дисциплини – клетъчна и молекулярна биология, генетика, растителна системна биология, физиология, биохимия и функционална геномика и биоинформатика ще улесни постигането на целите на проекта. Натрупването на данни за геномиката на моделните бобови растения може успешно да се използва за разбиране на биологията на културните бобови и за подобряване качеството и стопанските им характеристики. Иновативният и генеративен характер на резултатите свързани с изследване функцията на *MtGRAS7* гена при индуциран стрес, получени при изпълнение на проекта, ще даде възможност за продължаване на изследователската дейност и след приключване на проекта. Това е добро предусловие за разширяване на контактите на участниците с научни организации в България и други страни. Ценните резултати ще повишат възможностите за обединяване в консорциум, участие в проекти от програмите на Европейския съюз и присъединяване към световната научна общност.

Натрупаните резултати в рамките на проекта ще демонстрират как различни видове индуциран стрес ще стимулират или инхибират функцията на *MtGRAS7* гена и ще повлияят на важни процеси от растежа и развитието на моделното бобово растение, в това число и симбиотичната азотфиксация. Тези резултати ще покажат как се променя експресията на гени, свързани с отговора на растенията към екологичен стрес. Нашето очакване е модифицираната експресия (свръхекспресията и подтисната експресия) на *MtGRAS7* да се отрази върху преживяемостта на растенията при индуцираните стресови фактори. Може би ще открием пряка връзка между експресията на съответните гени и някои фенотипни белези на растенията с модифицирана експресия на *MtGRAS7*.

Очаквани резултати от първия етап на проекта включват създаването на T0 стабилни трансгенни растения със свръхекспресия и подтисната експресия на *MtGRAS7* (*MtGRAS7-OE* и *MtGRAS7-RNAi* растения), оценка на транскрипционното ниво на *MtGRAS7* транскрипционния фактор в релевантните трансгенни растения и селектирането им с цел получаване на T1 потомство. Ще бъдат оценени морфологичните показатели на трансгенни растения всравнение с дивия тип. Очаква се локализиране експресията на *GUS* маркерния ген под контрола на *MtGRAS7* ендегенния промотор по време на растителното развитие и след индуциране на стрес.

Ще бъдат детерминирани целевите домейни на GRAS протеиновите профили, и интегрирането им посредством специфичен софтуер. Ще бъдат използвани биоинформатични подходи за съпоставяне на свързаните протеинови секвенции, предсказване на геномната



структура и подредбата на хромозомите чрез синтении, както и реда на интроните и екзоните. Статистически ще се оценят изследваните транскрипти чрез йерархично клъстериране от различни данни от различни сайтове и среди на стресиране, както и оценки на диференциално експресирани транскрипционни фактори. Събраните резултати ще бъдат обобщени и статистически анализирани. Резултатите ще бъдат разпространени чрез научни публикации и участия в научни форуми.



Членове на научния колектив

Организации/участници¹	Бележка²
Базова организация:	
Агробιοинститут	
Ръководител на научния колектив	
гл. ас. д-р Миглена Николова Ревалска	ПД
Участници:	
Гл. ас. д-р Марияна Йорданова Радкова Доц. д-р Любен Иванов Загорчев Кети Асенова Кръстанова Соня Милева Иванова Иванела Андреева Албанова Емили Веселинова Кременлиева	ПД ПД; Биологически факултет, СУ Техник Техник СТ; Биологически факултет, СУ СТ; Биологически факултет, СУ
Партньорска организация:	
Софийски университет "Св. Климент Охридски" (СУ), Факултет по математика и информатика (ФМИ)	
Участници:	
доц. д-р Димитър Иванов Василев ас. д-р Ирена Юлкова Авджиева	ПД МУ

1 Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

2 Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)

През първият отчетен период на проекта чрез генетична трансформация на *M. truncatula* са създадени растения със свръхекспресия и подтисната експресия на *MtGRAS7* (*MtGRAS7-OE* и *MtGRAS7-RNAi*). Получените трансгенни растения са скринирани чрез PCR анализ за присъствие на *nptII* гена за антибиотична устойчивост към канамицин. Чрез qRT-PCR анализ е оценено транскрипционното ниво на *MtGRAS7* транскрипционния фактор в OE, RNAi-растения и див тип 2HA. Установено е, че нивото на транскрипта е повишено в OE и понижено в RNAi-растенията всравнение с 2HA. Фенотипиране *in vitro* показва добре развита коренова система, по-едри и закрълени/назъбени листа и ранен цъфтеж при OE-растенията, докато RNAi-растенията се характеризират с тесни и удължени листа, къси и леко удебелени корени, всравнение с дивия тип. Релевантните растения са селектирани за получаване на T1 потомство и по-нататъшни анализи.

Експресията на *MtGRAS7* гена е проследена в T1 трансгенни растения от *M. truncatula* отгледани в почва и в хидропонна система чрез използването на *GUS* анализ. Установена е локализация в проводящата система на листа, корени и листни дръжки, в симбиотичните грудки, и в цветовете. Тези резултати показват важната роля на *MtGRAS7* в процесите на растеж и развитие и симбиотична азотфиксация. Силната експресия в цветовете доказва участието му в семеобразуването. Растенията за анализ на промоторната активност на *MtGRAS7* са подложени на индуциран стрес от биотични фактори като ниска температура, засоляване и засушаване. В проби от различни части на растенията преди и след третиране се наблюдават отклонения в експресията на *MtGRAS7*. В повечето случаи с увеличаване времето на третиране интензитета на оцветяване се увеличава. Биотичен стрес е индуциран чрез паразитни растения от *Cuscuta campestris*, където *GUS* сигнала преминава от растението гостоприемник в паразита при мястото на инфекция. Получените резултати потвърждават ролята на *MtGRAS7* в отговора на растенията към стрес.

Въз основа на проучени публикации, свързана с GRAS белтъчната фамилия, както и на данните, достъпни в базата от данни UniProt, са селектирани секвенции на белтъците от семейството на GRAS транскрипционните фактори при растения от сем. Бобови, включително *M. truncatula* и *M. sativa*. Определени са функционалните домени на белтъците от това семейство, техният тип, позиция по дължината на секвенцията и вариации при различните членове на семейството. Двете основни секвенционни бази от данни за белтъци – UniProt и Protein (NCBI) са претърсени за хомоложни белтъци и белтъчни фрагменти от *M. sativa*. Подбрани сасъвпаденията със степен на сходство над 50%. С помощта на метода tBLASTx са подбрани кодиращи нуклеотидни секвенции от *M. sativa*, хомоложни на белтъци от семейството на GRAS-TF. Резултатите предстои да бъдат анализирани с цел да бъдат предсказани гени в *M. sativa*, които кодират аналогични белтъци в генома му. От базата от данни Gene Expression Omnibus са подбрани подходящи данни за проучвания на генната експресия при *M. truncatula*, за да бъдат използвани като тестов сет по време на втория етап от проекта с цел сравняване на



резултатите от диференциалната експресия, измерена в условия на биотичен/абиотичен стрес.

Част от резултатите по проекта са представени на международни научни форуми и са публикувани в списание с импакт фактор. Те ще допринесат значително за идентифициране на експресията и еволюционно систематизиране и аотиране на MtGRAS генното семейство при икономически важната култура люцерна. Познанията за моделното бобово растение *M. truncatula*, заедно с получената информация за експресията на агрономически важен ген свързан с отговора към стресови фактори, може да се пренесат върху икономически важни бобови култури като *M. sativa*.