



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ “П. ХИЛЕНДАРСКИ”

**Анотация на материалите по чл. 65 (1) от Правилника за
РАС на ПУ “Паисий Хилендарски”, включително
самооценка на приносите**

на гл. ас. д-р Елена Димитрова Апостолова-Кузова

Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“, Биологически факултет,
ПУ „П. Хилендарски“

във връзка с участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ по област
на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление **4.3. Биологически науки,**
научна специалност **Молекулярна биология,**
обявен в Държавен вестник, бр. 99 от 20.11.2020 г.

I. Съответствие с условията за заемане на академична длъжност „доцент“ по чл. 65. (1) от правилника за развитие на академичния състав на ПУ „П. Хилендарски“

Придобих докторската си степен през 2007 г. в Аграрен университет – Пловдив, в катедра „Генетика и селекция“. От 2011г. преподавам в Пловдивски университет „П. Хилендарски“ и съм част от екипа на катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“. През 2012 г. заех академичната длъжност „главен асистент“ по Молекулярна биология.

За участие в конкурса за заемане на академичната длъжност „доцент“ по научна специалност „Молекулярна биология“ представям общо 29 научни труда, които не са използвани в процедурите за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ и за заемане на академичната длъжност „главен асистент“. Те се класифицират в следните групи (в съответствие със списъка на научните трудове):

- ✓ публикации в списания с импакт фактор – 14 броя;
- ✓ публикации в научни списания без импакт фактор – 10 броя;
- ✓ глави от книги – 3 броя;
- ✓ учебници и учебни помагала – 2 броя.

Общ импакт фактор: 26,991

Общ SJR: 11,867

Общ брой цитирания: 153

Всички представени за рецензиране научни трудове са в съавторство, 24 от тях са на английски език, 2 са на български език. В 10 от представените научни статии съм водещ автор.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ С ИМПАКТ ФАКТОР

- 1. [Apostolova, E., Hadjieva, N., Ivanova, D.P., Yahubyan, G., Baev, V., Gozmanova, M. \(2021\) MicroRNA expression dynamics reshape the cultivar-specific response of pepper \(*Capsicum annuum* L.\) to potato spindle tuber viroid \(PSTVd\) infection. Scientia Horticulturae, 278, art. no. 109845. Q1; SJR - 0,838; IF - 2,769](#)**

Резюме: Вироида на вретеновидността при картофените клубени (PSTVd) е една от най-малките патогенни РНКи, заразяващи растенията. Той има пръстеновиден, едноверижен РНК геном, който може да приема специфична пръчковидна вторична структура, поради значителна самокомплементарност. PSTVd патогенността е сложен феномен, опосредстван от секвенционни и структурно-специфични характеристики на виroidните щамове, видово специфични геномни характеристики на гостоприемника, както и от взаимодействията между PSTVd и неговия гостоприемник в динамична среда. Микро РНКи, реагиращи на виroidи и тяхната потенциална роля, като регулаторни детерминанти в патогенността на PSTVd са

изследвани в два сорта български пипер (*Capsicum annuum* L.): Джулунска шипка (DS) и Куртовска капия (KK). В тези сортове, консервативни микро РНКи, като *cap-miR397*, *cap-miR398*, *cap-miR408* и *cap-miR482* показват специфична за сорта експресия при PSTVd инфекция на 28-ия ден след инокулацията (dpi), което е показано от секвенирането на малките РНКи и валидирано от RT-qPCR. За разлика от сорт KK, нивото на *cap-miR397a-5p* е значително намалено при инфектиран с PSTVd сорт DS, а експресията на съответния му целеви ген *Laccase-like 4* е пропорционално увеличена при 43 dpi, което предполага, че тази зависимост на микро РНК/иРНК е до голяма степен причина за чувствителността на DS към PSTVd. Тези резултати задълбочават разбирането за сортово-специфичната регулация на микро РНКи, свързани с PSTVd отговора в пипера и разширяват функционалната роля на микро РНКите в регулаторни мрежи, които работят в PSTVd - пипер патосистемата.

2. Gecheva G., Mollov I., Yahubyan G., Gozmanova M., **Apostolova E.**, Vasileva T., Nikolova M., Dimitrova-Dyulgerova I., Radoukova T. Can Biomarkers Respond Upon Freshwater Pollution? — A Moss-Bag Approach. *Biology*. 2021; 10(1):3. Q1; SJR - 1,739; IF - 3,796

Резюме: Ефекта от замърсяването на изворен мъх (*Fontinalis antipyretica* Hedw.) е проучван в три язовира, на територията на България (Кърджали, Студен кладенец и Жребчево). Първите два язовира са със старо промишлено замърсяване, а последния е замърсен с късоверижни хлорирани парафини (SCCPs). Растенията първоначално са събрани от чисти незамърсени води, след което са поставени за период от 30 дни в клетки, в съответните язовири. Настоящото проучване има за цел да установи органичното и неорганично замърсяване, водещо до съответни разлики в молекулярните, химичните и микроморфологичните маркери на изворния мъх. Подтиснатата експресия на голямата субединица на рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза (*rbcL*) се отчита при две от пробите, поставени във води, замърсени с тежки метали. Наблюдава се намаляване на общото съдържание на фенол (TPC) и в трите язовира, което дава основа за по-нататъшни изследвания на химичното съдържание на изворните мъхове. И в трите язовира е регистрирано увеличение на броя на клетките в листата ($p \leq 0,01$ за язовир Кърджали и $p \leq 0,001$ за язовирите Студен кладенец и Жребчево), както и на броя на стволите клетки в листата в язовир Жребчево ($p \leq 0,001$). Ширината на клетките намалява в изследваните антропогенно засегнати водни басейни. И трите изследвани групи биомаркери (молекулярни, химични и микроморфологични) показват, че са чувствителни към замърсяване на сладководни води. Получените резултати показват, че експресията на гена *rbcL*, TPC, броят и размерът на клетките са обещаващи инструменти за биомониторинг.

3. Raycheva, T., Stoyanov K., Naimov S., **Apostolova-Kuzova E.** "Crocus adamioides (Iridaceae) in Bulgarian flora." *Acta Botanica Croatica* 80, br. 1 (2021): 0-0. Q3; SJR - 0,289; IF - 1,051

Резюме: *Crocus adamioides* Kernd. et Pasche, както е прието да се класифицира отскоро, първоначално е отнасян към *C. biflorus* Mill. подс. *adamii* B. Mathew във флората на България от Mathew (1982) и проверено от Rukšāns (2017). Впоследствие таксонът е описан като отделен вид (Kerndorff et al. 2012) от холотип, събран в провинция Къркларели, Европейска Турция. Видът е картографиран за първи път в два флористични района на България. Диагностичните признаци,

базирани на общата морфология и анатомия на листата, са определени от естествените популации на вида и сравнени с типовия образец и съответните данни от литературата. Филогенетичната позиция на вида изяснихме чрез секвениране на вътрешния транскрибируем спейсър регион (Internal Transcribed Spacer (ITS): ITS1 + 5.SsrDNA + ITS2) и сравнение на получените секвенции с тези, налични в NCBI БД. Построихме филогенетично дърво, на основата на Bayesian алгоритъм. Резултатите показват най-голямо филогенетично сходство с *C. adamioides* от Турция. Най-близкият роднина *C. ranjelovicorum* Kernd., Pasche, Harpke et Raca остава в близост. Нашите морфологични, анатомични и молекулярни анализи на представители от българската популация *C. adamioides* разкриват особена комбинация от признаци.

4. **Apostolova E., M. Gozmanova, L. Nacheva, Z. Ivanova, V. Toneva, I. Minkov, V. Baev, and G. Yahubyan. (2020) MicroRNA profiling of the resurrection plants *Haberlea rhodopensis* unveils essential regulators of survival under severe drought. *Biologia Plantarum*, 64, pp. 541-550. Q1; SJR - 0,564; IF - 1,601**

Резюме: Малките РНКи са съществени компоненти на генно-регулаторните мрежи, които насочват развитието на растенията и влияят на приспособяването им към промените в околната среда. През последните години се натрупват много данни за ролята на малките РНК, но има оскъдни данни за значението им в оцеляването на растенията при екстремно засушаване. *Haberlea rhodopensis* е вид възкръсващо покритосеменно растение, чиито вегетативни тъкани могат да понасят засушаване и да се възстановят при рехидратация. High-throughput секвениране на малки РНКи в засушени вегетативна тъкан на *H. rhodopensis* в сравнение с тъканите, които не са подложени на стрес, показва висока сложност на популацията от малки РНК, особено от 24 нт категорията на малки РНК. В листата предсказахме 77 зрели микро РНКи, повече от които се отнасят към 23 високо консервативни семейства. Няколко члена от семействата miR156/157, miR166 и miR399 реагират на засушаване. Представители на фамилията miR156/157 са с повишена експресия при дехидратация и понижена при рехидратация, докато членовете на семействата miR166 и miR399 следват обратна тенденция на експресия. Въз основа на наличните геномни данни за този вид и тясно свързаният с него *Boea hygrometrica*, реконструирахме пълната секвенция на вероятния прицел на miR156/157, гена *SPL*. Количествен PCR анализ потвърди експресионния профил на hrh-miR156a-5p и hrh-miR157-5p, установен чрез секвениране на малки РНКи и разкри обратен модел на експресия между тези микро РНКи и техните таргетни гени в засушена тъкан. Нашето проучване предполага, че семействата miR156/157 и miR399 са от съществено значение за оцеляването на растенията при тежки засушавания, поради способността им да контролират развитието и растежа на растенията чрез модулиране на експресията на транскрипционни фактори.

5. **Naydenov M, Gospodinova N, Apostolova E, Anachkov N, Baev V, Gozmanova M, Minkov I, Yahubyan G. (2018) Transposon-associated polymorphisms of stress-responsive gene promoters in selected accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biochim Pol.* 65(3):391-396. Q2; SJR - 0,576; IF - 1,626**

Резюме: Генетичното разнообразие, причинено от движение на транспозонни елементи, може да играе важна роля в адаптацията на растенията към заобикалящата ги среда. По

отношение на гените, индуцираните от транспозоните алели са свързани с места в самите гени, а някои от тях и с промоторните региони. В това проучване, анализирахме промоторните области на 9 свързани със стреса гени за транспозонни вмъквания при 12 локуса от *Arabidopsis thaliana*. Промоторният скрининг извършихме чрез PCR амплификация с праймери, създадени да ог्राждат инсертираните транспозонни елементи в промоторните области на референтния сорт арабидопсис Col-0. Полиморфизми, свързани с инсерции/делеция (индел) на транспозонни елементи са идентифицирани в 7 от 12-те локуса на промоторите в изследваните сортове, които могат да се развият допълнително, като молекулярни маркери. Липсата на транспозонни елементи в промоторните области на ортоложните гени в *A. lyrata* показва, че вмъкването на тези транспозонни елементи в род *A. thaliana* е настъпило след разделянето му от *A. lyrata*. Анализът на последователността на промоторните региони на CML41 (Calmodulin-like protein 41) и CHAP (chaperone protein dnaJ-related) потвърждава инделните полиморфни места в четирите сорта - Col-0, Wassilewskija, Shahdara и Pirin. Наблюдаваният инделов полиморфизъм на CHAP промоторния регион е свързан със специфични профили на генна експресия в различните сортове, отглеждани при нормална и повишена температура. Събраните от нас данни могат да бъдат отправна точка за проучвания при профилиране на генна експресия при условия, наподобяващи естествените местообитания на сортовете.

6. Iliev I, Yahubyan G, Marhova M, **Apostolova E**, Gozmanova M, Gecheva G, Kostadinova S, Ivanova A, Baev V.: Metagenomic profiling of the microbial freshwater communities in two Bulgarian reservoirs. J Basic Microbiol. 2017; 9999:1–11. Q2; SJR - 0,545; IF - 1,580

ЦИТИРАНА В 8 статии:

Резюме: Микроорганизмите, обитаващи сладководна среда, са неразделна част от водните екосистеми. Налични са малко данни, относно профилите на микробните съобщества в язовирите в България, въпреки ключовата им роля в биогеохимичните процеси. В настоящото изследване ние проведохме първия изчерпателен метагеномен анализ на планктонното бактериално разнообразие при два големи и икономически важни български язовира - Батак и Цанков камък, използвайки секвениране от следващо поколение на 16S рибозомния РНК ген (16S рРНК). Анализът на данните за метагеномни ампликони, включително филтриране на качеството, групиране на оперативни таксономични единици и разпределение на таксономията, разкрива, че 78,45% от микробните съобщества между двата язовира се припокриват. Индексите на разнообразие (H) и равномерност на Pielou (J) намаляват по надлъжната ос на двата язовира. Очакваните стойности за индекса на разнообразието на Shannon обикновено се наблюдават в олиготрофните езера. В двата язовира доминират микробните съобщества от *Proteobacteria*, последвани от *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, всички те съставляват над 95% от относителното изобилие, независимо от големите хидрогеоложки разлики на язовирите. Бактериопланктонът се характеризира с висока филогенетична хетерогенност в таксономичната структура, разпределена между 211 рода. Родовете *Limnohabitans* и *Rhodospirillum rubrum* притежават абсолютен превес, което предполага тяхното значение във водните хранителни мрежи. Получените данни могат да допринесат за по-доброто систематично разбиране на микробното разнообразие на сладководната среда.

7. Ivanova Z., Sablok G., Daskalova E., Zahmanova G., **Apostolova E.**, Yahubyan G. and Baev V.: Chloroplast Genome Analysis of Resurrection Tertiary Relict *Haberlea rhodopensis* Highlights Genes Important for Desiccation Stress Response. *Front Plant Sci.* 2017 Feb 20; 8:204. Q1; SJR - 1,731; IF - 3,677

ЦИТИРАНА В 44 статии:

Резюме: *Haberlea rhodopensis* е палеолитен терциерен реликтен вид, известен най-вече като възкръсващо растение със забележителна толерантност към засушаване. Когато е изложена на силен стрес от засушаване, *H. rhodopensis* показва способност да поддържа структурната цялост на своя фотосинтетичен апарат, който се активира лесно при рехидратация. Тук представяме резултатите от асемблирането и анотирането на хлоропластния геном на *H. rhodopensis*, който впоследствие подложихме на сравнителен анализ с хлоропластните геноми на тясно свързани видове. Структурата на генома, подредбата на гените, съдържанието на GC и значението на кодоните са подобни на типичните хлоропластни геноми при покритосеменните растения. Геномът съдържа 137 гена, представляващи 70,66% от пластома, който включва 86 протеин кодиращи гени, 36 tРНК и 4 рРНК. Сравнителен анализ на пластома с други тясно свързани членове на *Lamiales* разкрива запазен генен ред в IR и LSC/SSC регионите. Филогенетичен анализ, базиран на гени, кодиращи протеини от 33 вида, определя този вид, като принадлежащ към семейство *Gesneriaceae*. От еволюционна гледна точка, сайт специфичен селекционен анализ детектира положително селектирани сайтове в 17 гена, повечето от които участват във фотосинтезата (например *rbcL*, *ndhF*, *accD*, *atpE* и др.). Наблюдаваните кодонови замествания могат да се интерпретират, като последица от молекулярната адаптация към засушаване, което осигурява еволюционно предимство на *H. rhodopensis*.

8. **Apostolova, E.**, Todorov, K., Dimitrova-Dyulgerova, I., Stoyanov, P., Mladenov, R., Yahubyan, G., & Naimov, S. (2017). Analysis of the sequence of ITS1 and ITS2 regions of Three *Mentha* species. *Plant Genetic Resources*, 15(6), 563-565. Q2; SJR - 0,353; IF - 0,712

Резюме: *Mentha* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*) е таксономично сложен род, състоящ се от 29 вида и 11 различни хибрида, включително редица икономически важни видове, сред които лечебни растения, използвани повече от 250 години. Поради високата си честота на полиплоидия, разнообразна морфология, висока степен на вариации на броя на хромозомите и междувидова хибридизация, *Mentha* се счита за таксономично предизвикателство. В тази статия описваме клониране и секвениране на вътрешния транскрибируем спейсърен регион (ITS) 1 и 2 при три вида мента: *Mentha aquatic* L., *Mentha longifolia* L. (Huds) и *Mentha piperita* L., събрани от естествени местообитания в България. При филогенетичния анализ на всички осем вида *Mentha*, открити в българската флора са тествани приложимостта на ITS1 и ITS2 за молекулярни пръстови отпечатъци, както и последващи сравнителни изследвания, включително ново получените последователности на ITS1 и ITS2.

9. **Apostolova E.**, Anachkov G., Todorov K., Dimitrova-Dyulgerova I., Mladenov R., Stoyanov P., Yahubyan G., Naimov S.: Genetic Variability of Chosen Bulgarian *Mentha* Species. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, Vol 69, N 6, 2016, 725-730. Q3; SJR - 0,209; IF - 0,251

ЦИТИРАНА В 3 статии:

Резюме: Сложна е систематиката на род *Mentha* от семейство *Lamiaceae*. Използването само на морфологични признаци е недостатъчно при разграничаване на различните видове мента. Важно е да се идентифицират и характеризират видовете мента за медицински и промишлени приложения. Настоящото проучване изследва ефективността на ISSR маркерите за оценка на генетичната изменчивост в този род и опит да се разграничат генотиповете в групата. Осемнадесет различни ISSR праймери са тествани върху пет български вида мента. Въз основа на молекулярните характеристики установихме ясно разпределение на генотиповете на построената дендрограма.

10. Naydenov M., Baev V., Apostolova E., Gospodinova N., Gozmanova M., Yahubyan G.: High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 02/2015; 87. Q1; SJR - 1,185; IF - 2,928

ЦИТИРАНА В 39 статии:

Резюме: Заедно със съществена роля в поддържането на целостта на генома, метилирането на ДНК участва в регулацията на гени, които са важни за развитието на растенията и реакцията им на стресови въздействия. При растенията, процесът на метилиране на ДНК може да бъде насочен от малки РНКи в процес, известен като РНК-насочено ДНК метилиране (RdDM), включващ две специфични за растенията РНК полимеразы - PolIV и PolV. Целта на настоящото ни проучване е да се изследва ефектът от топлинния стрес върху експресията на гени, кодиращи ключови участници в ДНК метилирането - ДНК метилтрансферазата (MET1, CMT3 и DRM2), най-големите субединици на PolIV и PolV (NRPD1 и NRPE1 съответно) и ДНК деметилазата ROS1. Също така, изследвахме високо температурния ефект върху два протеин кодиращи гена - *At3g50770* и *At5g43260*, чиито промотори съдържат транспозонни вмъквания и са засегнати от ДНК-метилиране, както и върху *AtSN1*, SINE-подобен ретротранспозон. За да се оцени участието на PolIV и PolV в реакцията на топлинен стрес, състоянието на метилиране на промотора и нивата на транскрипция на тези гени сравнихме между див тип и двойни мутанти, при които липсва NRPD1 и NRPE1. Резултатите демонстрират координирано регулиране на DRM2, NRPD1 и NRPE1 в отговор на висока температура и предполагат, че PolIV и/или PolV може да са необходими за индуцирането на DRM2 експресия при топлинен стрес. Потвърдихме, че експресията на ROS1 е потисната в мутанта, в който липсват активни PolIV и PolV, което може да е следствие от премахнатото ДНК метилиране. Повишената експресия на гена *At3g50770* в отговор на повишена температура корелира с намалено ДНК метилиране в промотора, докато реакцията на стрес на гена *At5g43260* не показва обратна корелация между метилирането на промотора и експресията на гена. Нашите резултати също показват, че PolIV и/или PolV могат да регулират генната експресия при стресови условия не само чрез RdDM, но и като действат в други регулаторни процеси.

11. Baev V., Milev I., Naydenov M., Vachev T., Apostolova E., Mehterov N., Gozmanva M., Minkov G., Sablok G., Yahubyan G.: Insight into small RNA abundance and expression in

high- and low-temperature stress response using deep sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 09/2014; 84. Q1; SJR - 1,061; IF - 2,756

ЦИТИРАНА В 20 статии:

Резюме: Определяне на профила на малки РНКи и оценка на неговата зависимост от променящите се фактори на околната среда разшириха нашето разбиране за транскрипционната и посттранскрипционната регулация на реакциите на стрес на растенията. До момента са документирани оскъдни данни, за да се опише профила на класовете малки РНКи при температурен стрес. В настоящото проучване ние правим сравнителна оценка на геномното профилиране на малки РНКи в *Arabidopsis thaliana*, използвайки два условни отговора, индуцирани от висока и ниска температура. Профилирането на малки РНКи в целия геном разкрива изобилие от 21 нт малки РНК при ниска температура, докато високата температура води до изобилие от 21 нт и 24 нт малки РНКи. Двете температурни третирания променят експресията на специфична подгрупа зрели микро РНКи и показват диференциална експресия на редица микро РНК изоформи (isomiRs). Сравнителният анализ показва, че голям брой протеин кодиращи гени, могат да доведат до диференциално експресирани малки РНКи след температурни промени. Ниската температура причинява натрупване на малки РНКи, съответстващи на „sense“ веригата на редица гени, свързани с нискотемпературен стрес. За разлика от това, високата температура стимулира продуцирането на малки РНКи от двете полярности от гени, кодиращи функционално различни протеини.

12. Cabrita L., **Apostolova E.**, Neves A., Marreiros A., Leitão J.: Genetic diversity assessment of the almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) traditional germplasm of Algarve, Portugal, using molecular markers. *Plant Genetic Resources* 07/2014; 12(S1):164–S167. Q2; SJR - 0,338; IF - 0,580

ЦИТИРАНА В 4 статии:

Резюме: Проучени са 123 бадемове (*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb) дървета, сред традиционните овощни градини в региона на Алгарве, Португалия и 53 дървета от местната полева колекция, управлявана от регионалното бюро на Португалското министерство на земеделието (DRAALG). Целта на проучването е оценка на генетичното разнообразие и генетична свързаност, както и идентифициране на нови сортове, с помощта на изозими, единични нуклеотидни повторения и микросателитни техники. Анализът на изозимите позволи разпределението на 176 растения в 13 различни класа ензимни сходства, докато използването на ДНК маркерите увеличи разпределението на анализирания дървета сред 140 дискриминиращи ДНК модела. В местната зародишна плазма идентифицирахме множество случаи на омонимия и синонимия. Някои традиционни сортове, като Lourencinha, изглеждаха относително еднородни, докато други местни доминиращи сортове, напр. Galamba, включват разнообразни генотипове. От 13^{-те} търговски сорта, анализирани от нас, 11 са събрани в един основен клъстер, ясно разграничаващ се от повечето местни генотипове. Тези резултати затвърдиха схващането, че традиционната зародишна плазма в Алгарве представлява важно хранилище на генетично разнообразие, като притежава алели с важен селскостопански интерес. Пример за това е наскоро идентифицираната устойчивост към *Phomopsis* в традиционния сорт Barrinho Grado.

13. Valkova R., Apostolova E., Naimov S.: Plant molecular farming: Opportunities and challenges. Journal of the Serbian Chemical Society 01/2013; 78(3):407-415. Q3; SJR - 0,269; IF - 0,889

ЦИТИРАНА В 2 статии:

Съвременният живот е невъзможен без продукти, получени с помощта на техниките използвани в класическата, съвременна биотехнология. Мащабното производство на биотехнологични изделия, обаче открива дискусия за икономическото въздействие, управлението на отпадъците, биобезопасността и биоетичните проблеми. Растителното молекулярно земеделие предлага сравнително евтина опция за добив на много ценни продукти и демонстрира редица предимства пред класическите технологии, но също така повдига въпроси за по-нататъшни перспективи за развитие, идентифициране на опасностите и оценка на риска. Това ревю е фокусирано върху тези два въпроса: предлаганите възможности и предизвикателствата, пред които са изправени съвременните системи за растително молекулярно земеделие.

14. Apostolova E., Rashkova M., Anachkov N., Denev I., Toneva V., Minkov I., Yahubyan G.: Molecular cloning and characterization of cDNAs of the superoxide dismutase gene family in the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Plant Physiology and Biochemistry 04/2012; 55:85-92. Q1; SJR - 1,144; IF - 2,775

ЦИТИРАНА В 12 статии:

Резюме: Възкръсващите растения могат да толерират почти пълна загуба на вода във вегетативните си части. Супероксид дисмутазите (СОД) са основни ензими за защита срещу окислителните повреди, причинени от водния стрес. Ние клонирахме и характеризирахме копии ДНКите на цялото SOD генно семейство, във възкръсващото растение *Haberlea rhodopensis*. Седем копии ДНКи с пълна дължина и техните частични геномни клонове получихме чрез комбинация от PCR, с дегенеративни праймери, RT-PCR и RACE. Получените аминокиселинни последователности показаха много висока степен на сходство с цитозолни Cu,Zn-SODs (HrCSD2, HrCSD3), хлоропластни Cu,Zn-SODs (HrCSD5) и други Cu,Zn-SODs (HrCSD4), Mn-SODs (HrMSD) и Fe-SOD (HrFSD). Една копия ДНК класифицирахме, като псевдоген (HrCSD1). Установихме, че всички идентифицирани от нас SOD гени се експресират на транскрипционно ниво. HrCSD2, HrCSD5, HrMSD и HrFSD са конститутивно експресирани във всички органи, докато HrCSD3 и HrCSD4 са органо-специфични. Транскриптите на конститутивните SOD гени открихме в значителни нива дори във въздушно сухи листа. Мултигенното семейство SOD на *H. rhodopensis* е първото изследвано семейство SOD сред възкръсващите растителни видове. Нашите открития за достатъчно високи нива на SOD транскрипти в напълно дехидратирани листни тъкани корелират със запазване на активността на SOD и със способността на *H. rhodopensis* да възкръсне при рехидратация. Поради ендемичния и реликтен характер на този вид, установените от нас факти могат да помогнат за по-нататъшно изясняване на еволюционните връзки между различни изоформи на SOD при различни растителни видове.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ БЕЗ ИМПАКТ ФАКТОР

- 15. Popova T., Mustafov A., Stankova G., Apostolova E. (2019) Mutagenic and Cytotoxic Effects of Pesticide Lambada 5EK (Lambda-Cyhalothrin) on Sweet and Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.), Beetroot (*Beta vulgaris*) and Onion (*Allium cepa*) In Vivo. *Ecologia Balkanica*. 11(2): 79-86. Q4; SJR - 0,134**

Резюме: Целта на настоящата работа е да изследват потенциалните мутагенни и цитотоксични ефекти на синтетичния пиретроиден инсектицид Lambada 5EK в кореновите меристеми на някои зеленчуци. Изследвани са две концентрации на пестицида (0,03% - препоръчва се в земеделските практики и десетократно по-ниска концентрация - 0,003%) и са изследвани три растителни вида, широко използвани като храна - сладък и лют пипер (*Capsicum annuum* L.), цвекло (*Beta vulgaris* L.) и лук (*Allium cepa* L.). Получените резултати по отношение на влиянието на пестицида върху митотичното клетъчно делене и хромозомния статус показват, че видовете имат различна чувствителност към пестицидното действие. Лютата чушка беше най-чувствителна от всички тествани растителни видове към въздействието на пестицида при митоза и по-ниски стойности на митотичен индекс бяха регистрирани и при двете тествани концентрации в сравнение с контролата. Най-често наблюдаваните хромозомни аберации са: анафазни/телофазни мостове, изоставащи ацентрични хромозоми и/или хромозомни фрагменти и клетки с микроядра; те бяха открити във всички тествани растителни видове, с изключение на цвекло, обработено с 0,003% разтвор на пестицида. Тези резултати предполагат, че цвеклото притежава известна издръжливост на мутагенното действие на инсектицида и вероятно е подходяща култура в сеитбооборота в селскостопанската практика, когато се използват ламбда-цихалотринови пестициди.

- 16. Apostolova E., Naimov S. (2019) Development of Copy DNA Library of *Haberlea rhodopensis* Friv. Nationl scientific conference with foreign participation “Science and Society, 2019”; 2-3 Oktober 2019, Kardzhali, Bulgaria, 396-401.**

Резюме: Въз основа на получените експериментални данни и тяхната биоинформатична интерпретация ние разработихме копи ДНК библиотека от родопски силивряк (*Haberlea rhodopensis* Friv.). Анализирахме са 384 ДНК секвенции от копи ДНК библиотека от *Haberlea rhodopensis*. Анотирахме 374 секвенции, като 332 от тях са обвързани с определена функция, а 42 са отнесени към групата на секвенции без хомолози или ортолози. Установихме секвенциите на 40 регулаторни белтъка, като 18 от тях са подбрани като база за разработване на сонди за последващ PCR анализ в реално време. Представените в пълна дължина копи ДНК клонове преведохме във форма, подходяща за последващо публикуване в NCBI.

- 17. Апостолова Е., Н. Хаджиева, Д. Иванова, Н. Томлекова, Г. Яхубян, В. Баев, М. Гозманова. (2019) Характеризиране на малки РНК в PSTVd – индуцирания отговор на два български сорта пипер – ЮБИЛЕЙНА НАУЧНА СЕСИЯ „ДНИ НА НАУКАТА – 2019”, посветена на 75-годишнината от създаването на Съюза на учените в България; 31 октомври 2019 г. Дом на науката –Пловдив.**

Резюме: Българските сортове пипер: Куртовска капия (КК) и Джулюнска шипка (ДШ) са гостоприемници на PSTVd KF440-2. Специфична за PSTVd фенотипна изява на 28 ден след инфекция е наблюдавана при ДШ; Специфични PSTVd прочети, изолирани от библиотеки на

двата сорта, са картирани върху PSTVd KF440-2 референтната секвенция и разпределението им по цялата дължина на (+) и (-) веригите показва, че вирида се реплицира и в двата сорта. Горещите точки на PSTVd специфичните прочети са определени в терминален ляв и десен домени на вирионната молекула. Присъствието на значителен брой PSTVd сиРНК с единични нуклеотидни замени в определени позиции (298, 299 и 333), предполага *de novo* индуцирани PSTVd варианти в сортовете пипер.

18. Valkova R., Zahmanova G., Apostolova E., Kostova M., Minkov I.: Ethyl methane sulfonate induced mutation phenotype in M1 generation of *Paulownia tomentosa*. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans. 2017, 20 (5), 283-295.

Резюме: Пауловния е бързорастящ вид широколистни, листопадни дървета, с твърда дървесина, чиято родина е Китай. Притежава редица ценни качества, като устойчивост на гниене, висока температура на възпламеняване и дървесина устойчива към деформации. Освен това е красиво орнаментно дърво, отличен ресурс за биоетанол, както и източник на вторични метаболити. Изключителната стойност на *Paulownia tomentosa*, като стопански интересен обект, предопределя и интензивната научна работа с това растение в различни направления. Едно от тях е индуциране на мутагенез посредством третиране с мутагенни фактори.

За увеличаване на генетичното разнообразие при културните растения се използва химичен и физичен мутагенез, което е довело до създаване на много нови сортове. Сред химичните мутагени етил метан сулфонатът (EMS) е от доказано най-мощните.

Настоящата работа представя прилагането на EMS с концентрация 0.6% v/v, за обработка на 100 семена от *Paulownia tomentosa* (PT), в продължение на 12ч., след което бе проследено за фенотипни промени в полученото поколение (M1). Идентифицирано бе растение с фенотип подобен на джуджевидно растение (DWL) – има нарушена апикална доминантност, множество странични разклонения, листа с намален размер и скъсени междувъзлия.

Третиране с гиберелинови киселини (GA3), джуджевидните растения удължиха стъблата си, но останаха с разклонени стъбла и по-малки листа. При прилагане на ауксините Indole-3-acetic acid (IAA) и 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) джуджевидният фенотип не се промени. DWL култивирани *in vivo* и пръскани с епибрасиностероиди (EBR), не показват промяна в своя фенотип, но DWL култивирани *in vitro* на среда с EBR имат удължени междувъзлия, листа с нормален размер и останаха без разклонения. Джуджевидният фенотип може да бъде свързан с недостига на брасиностероиди, като резултат на понижена биосинтаза или засягане регулацията на други гени свързани с брасиностероидите.

19. Apostolova E., Krastev V, Yahubyan G, Svetleva D, Parvanova P, Mitrovska Zh, Chankova S. Molecular Analysis of Bulgarian Common Bean Genotypes and their Characterization after Growing under Rainfed and Irrigated Conditions. International Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 1(4) 2014, 50-57.

Резюме: Проведохме експерименти в опитните полета на Аграрен университет - Пловдив, България. Приложихме стандартен метод за отглеждане в 5 повторения. Извършихме биометрична оценка на обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) - 10 мутантни линии и 10 сорта,

отглеждани при дъждовни и поливни условия. Основни признаци, свързани с добива: височина на растението, маса на растенията с бобовите, брой клони, височина на залагане на първия боб, брой плодоносни клонки, брой бобове на растение, тегло на боба със семената, тегло на семената и средна дължина на 10 боба. Мутантна линия D2-0.0125 M EMS има най-добри показатели по отношение на проучваните признаци сред другите мутантни линии и може да бъде включена в схемите за размножаване и оценка като нов сорт. Сорт BAT 477 се отличава значително по своите признаци от другите генотипове, независимо от начина на отглеждане. На проучваните растения са направени RAPD и ISSR анализи. На базата на молекулярните анализи установихме ясно разпределение на генотипове на дендрограми, изготвени с помощта на софтуер NTSYS. Затвърдихме, че изследваните български сортове са обещаваща зародишна плазма и са подходящи за въвеждането им в схеми за хибридизационно размножаване, както и за прилагане на мутагенеза и биотехнологични подходи.

20. Рашкова М., Апостолова Е., Дончева С., Тонева В., Минков И. и Яхубян Г. (2011)
Проследяване на експресията в условия на воден стрес на гени, кодиращи изоформи на супероксид дисмутаза при родопския силивряк *Haberlea rhodopensis*. *Trav. Sci. Univ. Plovdiv, Plantarum*, Том 41, Кн.6, 17-24.

Резюме: Установихме повишена експресията на гените, кодиращи СОД при *in vitro* растения от Родопски силивряк, които са подложени на засушаване от 72 часа, и още по-високо ниво на експресия при засушаване от 144 часа. При последващо рехидратиране е налице намаляване на транскрипционните нива на експресия на изследваните гени.

21. Krasteva L., E. Apostolova, D. Dimova, D. Svetleva: Correlation dependences between twenty-one traits of some Bulgarian common bean genotypes. Acta horticulturae 06/2009. Q3; SJR - 0,223

ЦИТИРАНА В 2 статии:

Резюме: Основната цел на това изследване е да се оцени взаимовръзката между обичайните количествени признаци на семената при обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L.), като се използват коефициенти на корелация. Друг акцент е да се избере най-перспективният от изследваните генотипове, притежаващ най-добри признаци, интересни за по-нататъшни селекционни програми. Проведохме тригодишни проучвания (2003 - 2006 г.) на тридесет и един български генотипа обикновен фасул. Оценихме 21 важни признака, касаещи семената, бобовите и растенията. Установихме силни положителни корелации между следните признаци: тегло на боба със семена и дължина на бобовите; брой бобове с тегло на семената на растение; тегло на семената на растение с тегло на надземната част и брой възли, носещи бобове; брой бобове на растение с брой възли, носещи бобове; тегло на надземната растителна част с брой възли, носещи бобове, дебелина на хипокотилите и брой бобове на растение. Констатирахме отрицателни корелации между следните белези: височина на залагане на най-ниския боб с брой бобове (под 10 см), тегло на семената на растение, брой клони, носещи бобове, брой бобове на растение и семена в боб. Селекционерите могат да използват всички тези корелационни връзки при по-нататъшна работа в селекционни програми.

22. Apostolova E., D. Svetleva: ISSR Markers Linked to the Two Genes Determining Indeterminate Growth Habit (*Fin*) and Seeds' Color (*P*) in Common Bean. *Acta horticulturae* 06/2009. Q3; SJR - 0,223

Резюме: Приложихме BSA (Bulked Segregant Analysis) анализ за идентифициране на ISSR маркери, свързани с гените, определящи типа на хабитуса (*Fin*) и цвета на семената (*P*) във F₂ поколение обикновен фасул, на кръстоската А 195 и Кристал 137. Сорт А 195 има детерминантен тип на хабитуса и кафяви семена, докато Кристал 137 има индетерминантен тип на хабитуса и бели семена. Две различни обединени проби ДНК получихме от равни обеми стандартизирана ДНК на тези растения. Сред 72^{-те} ISSR праймера, използвани от нас за дискриминация на двата родителски генотипа и между двете ДНК обединени проби (детерминантни спрямо индетерминантен), само 32 (44,44%) амплифицират полиморфни маркери. Предварително потвърдени 10 праймера амплифицират ясни полиморфни ивици. Те бяха допълнително тествани сред 100 растения от F₂. Анализът на генетичната връзка между проучваните молекулярни маркери и локусите за индетерминантен тип на хабитуса и цвят на семената извършихме с помощта на програмата Join Map 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001). Логаритъмът на коефициентите (LOD) от 3.0 използвахме като праг на свързване за групиране на връзки. Разстоянията на генната карта (cM) между локусите изчислихме въз основа на стойностите на рекомбинационния коефициент, използвайки функцията за картиране на Kosambi (Kosambi, 1944). Картирахме ISSR маркер L11, на разстояние - 40,9 cM от гена *P* (LODlinkage 3.21) и 41.5 cM от гена *Fin* (LODlinkage 3.48). Картирахме и маркерът ISSR L8 до гена *Fin* на разстояние 44,1 cM (LODlinkage 3.10). ISSR маркерите, открити в това проучване, могат да се използват за избор на някои нива на количествени признаци, свързани с *Fin* и *P* гени в обикновения фасул.

23. Panayotov N., E. Apostolova, D. Dimova, D. Svetleva: Inheritance of Some Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) traits in the cross A 195 × Kristal 137. *Acta horticulturae* 06/2009; 830(830):221-228. Q3; SJR - 0,223

ЦИТИРАНА В 1 статия:

Резюме: Проведохме тригодишни (2003 – 2006 г.) проучвания за изследване на унаследяването на някои признаци при обикновения фасул (*Phaseolus vulgaris* L.). За целта анализирахме растения от F₂ поколение на кръстоската между сортовете А 195 и Кристал 137. Установихме, че повечето от изследваните признаци: височина на растенията, тегло на надземни растителни части, брой клони, носещи бобове и бобове, височина на залагане на първия боб, дължина и ширина на бобовете, брой семенни пъпки и семена, маса на семената, маса на едно семе и дължина на семената, са с по-висока степен на унаследяване. Това е важен показател за успешен подбор според тези признаци. Коефициентите на унаследяване на признаците - дължина на бобовия връх (23,08%) и тегло на бобовете на растение (25,74%) са по-ниски, но над 20%. Признака - брой на клоните е по-силно повлиян от факторите на околната среда. Характеристиките: брой семена в боб, тегло на боба със семена, размер и брой бобове, брой възли, носещи бобове и тегло на надземните части на растенията се контролират в равна степен от генотипа и условията на околната среда. Влиянието на генотипа е определящо за проява на признаците - размер на семената и бобовете, както и брой на бобовете, заложени под 10 см. Признаците: брой на семената в боб, тегло на бобовете със семена и брой на бобове на растение са от голямо значение за формиране на добива при обикновения фасул, но те показват по-голяма

вариабилност в нашите изследвания. Известно е, че високото ниво на унаследяване в широк смисъл, е важно за първите стъпки при селекция - изборът на елитни растения с желани признаци. Коефициентът на наследяване в тесен смисъл, е важен във втората фаза на селекция - създаване на нови селекционни линии с по-добри комбинации от желани признаци.

24. Apostolova E., J. Carlier, J. Leitão, D. Svetleva: Identification of RAPD markers linked to the *Fin* and *P* loci in *Phaseolus vulgaris* L. *Acta horticulturae* 06/2009; 830(830):101-106. Q3; SJR - 0,223

Резюме: Използвахме групов сегрегантен анализ за идентифициране на случайно амплифицирани полиморфни ДНК (RAPD) маркери, свързани с гените за тип на хабитуса (*Fin*) и цвят на семената (*P*) в обикновения фасул (*Phaseolus vulgaris* L.). Анализа приложихме на F₂ популация от растения, получена от кръстосването на сортовете А 195 и Кристал 137. Сортът А 195 се характеризира с детерминантен тип на хабитуса и кафяво оцветени семена, докато Кристал 137 показва индетерминантен тип на хабитуса и бели семена. Сред 140 RAPD праймера, използвани за разграничаване между двата родителски генотипа, само 64 (45,71%) амплифицират полиморфни маркери. Деветнадесет праймера амплифицират ясни полиморфни ивици и тествахме допълнително сред 100 F₂ растения. Анализът на генетичната връзка между анализирания молекулен маркер и локуса за тип на хабитуса и цвят на семената извършихме с помощта на програмата Join Map 3.0. Логаритъмът на коефициентите (LOD) от 8.0 и 10 използвахме като прагове за групиране на връзките, съответно на локуса *Fin* и локуса *P*. Установихме един RAPD маркер - AA18_600-P1, свързан с *Fin* локуса, който определя типа на хабитуса и се картира на 17,6 cM отстояние от него (препоръчителна честота = 0,162). Идентифицирахме пет RAPD маркера, свързани с *P* локуса, като разстоянията до този локус варираха от 4.1 cM (маркер AB18_1500-P2, препоръчителна честота = 0.034) до 42.6 cM (маркер Q03_700-P1).

ГЛАВИ ОТ КНИГИ

25. Galina Yahubyan, Elena Apostolova, Ivan Minkov, Vesselin Baev: Small RNAs in Crop Response to Temperature Stress Non-coding RNAs in Plants. Handbook of Plant and Crop Physiology, Third Edition edited by Mohammad Pessarakli, 04/2014: chapter 35: pages 785-794; CRC Press, Taylor & Francis Group., ISBN: 9781466553286

Резюме: Материалите, представени в тази глава, разкриват важните роли на разнообразен набор от малки РНК в отговор на температурен стрес при културните растения. До този момент са положени големи усилия за характеризиране на участието на консервативни и специфични за видовете микро РНК в отговор на стресови въздействия. Бъдещите изследвания вероятно ще идентифицират други видове малки РНК, които участват в отговор на различни стресови фактори. Непубликувани данни от NGS анализ на температурно третиран *Arabidopsis* разкриват, че ниските и високите температури водят до напълно различни малки РНК профили и влияят на производството на малки РНК-и от определени групи протеин кодиращи гени.

26. Mariyana Gozmanova, Vesselin Baev, Elena Apostolova, Gaurav Sablok, and Galina

Yahubyan: Growing Diversity of Plant MicroRNAs and MIR-Derived Small RNAs. Plant Epigenetics, Part of the series RNA Technologies, 2017, pp 49-67. Editors: Nikolaus Rajewsky, Stefan Jurga, Jan Barciszewski, ISBN: 978-3-319-55519-5 (Print) 978-3-319-55520-1 (Online)

Резюме: Малките некодиращи РНКи са основни регулаторни молекули в растителния геном. Малките РНКи са класифицирани въз основа на тяхната биогенеза и начин на действие в два основни типа - микро РНКи и малки интерфериращи РНКи. Растителните микро РНКи обикновено са с дължина 21 нуклеотида и произлизат от уникални генетични локуси (*MIR* гени). Подходите за секвениране от следващо поколение са увеличили значително броя на известните растителни микро РНКи и са разкрили, че *MIR* гените често произвеждат малки РНКи, известни като микро РНК варианти, изоформи или *isomiRs*, които показват разлики от съответните им „референтни“ зрели последователности. Основният механизъм на действие на каноничните микро РНКи е секвенционно-специфична репресия на генната експресия на посттранскрипционно ниво. Неотдавнашни проучвания разкриха, че неканонични микро РНКи и получени от *MIR* малки интерфериращи РНКи (определена подгрупа от *isomiRs*) могат да действат също и в транскрипционно-специфично транскрипционно заглушаване, като по този начин влияят върху функцията на генома чрез метилиране на ДНК. Освен това, микро РНКите могат да се регулират чрез епигенетична промяна, като метилиране на ДНК и хистонов модификации на *MIR* гени. Имайки значителна роля в генетичния и епигенетичния контрол, растителните микро РНКи и получените от *MIR* малки интерфериращи РНКи, потенциално могат да участват в повечето процеси на развитие, реакция на стреса на растенията и адаптация. В тази глава ние обсъждаме биогенезата на микро РНКи и получените от *MIR* малки РНКи и тяхното регулаторно въздействие върху експресията на растителните гени. Алгоритмите за точно аотиране на нови микро РНКи и *isomiR* последователности все още са предизвикателна задача, изискваща интегриране на експериментални и изчислителни подходи. Тук накратко представяме някои скорошни инструменти, които са разработени, за да улеснят тази задача, като предоставят удобен потребителски интерфейс, без да изискват компютърни умения за целите на анализа.

27. „Нанонауки и нанотехнологии“; ДНК технологии; В Сборник с обзорни статии; Самир Наимов и Елена Апостолова; ПУ Паисий Хилендарски; 2017; ISBN: 978-619-202-282-2.

Резюме: Помагалото по Нанонауки и нанотехнологии има за цел да представи накратко пред учителите по природни науки аспекти на връзката между нанотехнологиите и съвременните науки физика, химия и биология. Замисълът е да се осигури информационно учебна програма на тематичен едноименен курс, предназначен за обогатяване на природонаучните знания на учителите, организиран от Химическия факултет на ПУ “Паисий Хилендарски”. В частност главата “ДНК технологии” описва основните видове наноструктури, получени на базата на молекули на дезоксирибонуклеинови киселини, и за методите на асемблирането им.

УЧЕБНИЦИ И УЧЕБНИ ПОМАГАЛА

28. Ръководство по биоинформатика; Веселин Баев В., Елена Апостолова, Евелина

Даскалова, Георги Минков; ПУ Паисий Хилендарски; 2013, v1.03; ISBN: 978-954-423-835-3.

Ръководството по Биоинформатика има за цел да подпомогне извеждането на лекционните и практически занятия по Биоинформатика и Биоинформатичен анализ, които са задължителни дисциплини за учебните програми на специалностите Молекулярна биология, Фармацевтични биотехнологии, Микробиология и вирусология, Медицинска биология и Биоинформатка, в Биологическия факултет на ПУ „П. Хилендарски“. Ръководството запознава студентите и ги подготвя за работа с: бази данни за нуклеотидни секвенции и протеинови секвенции, специализирани бази данни, сравняване на двойка секвенции (pairwise alignment), сравняване на множество секвенции (multiple alignment), търсене на хомоложни секвенции в бази данни, както и изграждане на филогенетични дървета.

29. „Практикум по генно инженерство“; Самир Наимов и Елена Апостолова; ПУ Паисий Хилендарски; 2020; ISBN: 978-619-202-598-4.

Помагалото по Генно инженерство има за цел да подпомогне извеждането на практически занятия по Генно инженерство и Молекулярна биотехнология, които са задължителни дисциплини за учебните програми на специалностите Молекулярна биология, Фармацевтични биотехнологии, Микробиология и вирусология и Биоинформатка, в Биологическия факултет на ПУ „П. Хилендарски“. Помагалото запознава студентите и ги подготвя за работа с методи и техники, използвани за провеждане на бактериална трансформация, за установяване и доказване на трансформирани с GFP (green fluorescent protein) бактериални клонове - изолиране, хроматографско пречистване и електрофоретично разделяне на GFP, както и Полимеразна Верижна Реакция (PCR) за идентифициране на рекомбинантния плазмид pGLO, носещ GFP.

Помагалото съдържа 12 протокола, по-голямата част от които са структурирани така, че студентът да получи теоретична подготовка по темата на упражнението (въведение или увод), да се запознае с процеса на планиране на експеримента (вкл. лабораторно оборудване и консумативи) и с хода на работа, както и с начините за отчитане на резултатите, за да може най-накрая да провери новите си знания чрез тестови задачи. Студентите се подпомагат в извеждането на експериментална работа от множество фигури, онагледяващи последователните стъпки в хода на работа.

II. Самооценка на научните и преподавателски приноси

Приносите на представените материали за участие в конкурса за заемане на академичната длъжност “доцент” по научна специалност Молекулярна биология могат да бъдат групирани в няколко направления:

1. Регулация на генната експресия;
2. ДНК маркери и генотипиране;
3. Секвениране и аотиране на хлоропластни геноми;
4. Молекулярна екология;

5. Приноси в областта на учебната дейност.

1) Регулация на генната експресия

Малките некодиращи РНКи са основни регулаторни молекули в растителния геном. На основата на произход и начин на действие те се класифицират в две основни групи – микро РНКи и малки интерфериращи РНКи. Растителните микро РНКи обикновено са с дължина 21 нуклеотида и възникват от уникални генетични локуси (*MIR* гени). Подходите за секвениране от следващо поколение увеличават значително броя на известните растителни микро РНКи. *MIR* гените често водят до появата на малки РНКи, известни като микро РНК варианти, изоформи или изомирове, които се различават от съответните им „референтни“ зрели последователности. Основният механизъм на действие на каноничните микро РНКи е секвенционно-специфична репресия на генната експресия на посттранскрипционно ниво. Има изследвания, които показват, че неканонични микро РНКи и получени от *MIR* малки интерфериращи РНКи могат да действат също и в транскрипционното заглушаване, като по този начин влияят върху функцията на генома чрез метилиране на ДНК. Освен това, микро РНКите могат да се регулират чрез епигенетична промяна, като метилиране на ДНК и хистонов модификации на *MIR* гени. Предвид важната роля в генетичния и епигенетичния контрол, растителните микро РНКи и техните варианти потенциално могат да участват в редица процеси на развитие, отговор на растенията към стресови въздействия и процеси на адаптация. В тази глава ние разглеждаме биогенезата на микро РНКите и изоформите им, както и тяхното регулаторна функция в експресионния контрол на растителните гени. Алгоритмите за точно аотиране на нови микро РНКи и изомирове е предизвикателство, изискващо интегриране на експериментални и изчислителни подходи. Ние накратко сме представили някои съвременни инструменти, които са разработени, за да улеснят тази задача. Описваме удобен потребителски интерфейс, без да се изискват компютърни умения за целите на анализа (**Публикация 26**).

Определянето на профила на малки РНКи и оценката на зависимостта му от променящите се фактори на околната среда задълбочават разбирането за транскрипционната и посттранскрипционната регулация, в отговор на стресови въздействия при растенията. В **Публикация 25** ние разкриваме значението на разнообразен набор от малки РНКи в отговор на температурен стрес при културни растения. Растения от *Arabidopsis thaliana* подложихме на температурен стрес. Получените данни от секвениране от следващо поколение разкриха, че ниските и високите температури водят до напълно различни профили на малките РНКи и влияят на генерирането на малки РНКи от определени групи протеин кодиращи гени. Профилирането на малки РНКи в целия геном разкри изобилие от 21 нт малки РНКи при ниска температура, докато високата температура показва изобилие от 21 нт и 24 нт малки РНКи. Температурния стрес променя експресията на специфична подгрупа зрели микро РНКи и води до диференциална експресия на редица микро РНК и изоформи. Проведения от нас сравнителен анализ показва, че в резултат на температурен стрес голям брой протеин кодиращи гени водят до диференциално експресирани малки РНКи. Нискотемпературен стрес е причина за натрупване на малки РНКи, съответстващи на смислената верига на редица гени. За разлика от него, високата температура стимулира продуцирането на малки РНКи и от двете вериги на гени, кодиращи функционално различни протеини (**Публикация 11**).

Един от обектите, с които работи нашата научно-изследователска група е моделния организъм за възкръсващите растения, ендемичния реликтен вид *Haberlea rhodopensis* – Родопски силивряк.

Малките РНКи са съществени компоненти на генно-регулаторните мрежи, които насочват развитието на растенията и го приспособяват към променящите се фактори на околната среда. Възкръсващите растения могат да толерират почти пълна загуба на вода във вегетативните си части. Приложили сме нови технологии за секвениране на малки РНКи. Във вегетативните тъкани на подложени на засушаване растения от *H. rhodopensis* в сравнение с тъкани на растения, които не са подложени на стрес показаха голяма сложност на популациите от малки РНКи, особено на тази с дължина 24 нт. В листата предсказахме 77 зрели микро РНКи, повече от които се отнасят към 23 високо консервативни семейства. Установихме, че няколко члена на семействата miR156/157, miR166 и miR399 реагират на засушаване. Членовете на семейството miR156/157 са с повишена експресия при дехидратация и понижена експресия при рехидратация, докато членовете на семействата miR166 и miR399 следват обратна тенденция на експресия. Въз основа на наличните геномни данни за този вид и тясно свързаният с него *Boea hygrometrica* реконструирахме пълната секвенция на вероятния прицел на miR156/157 - гена *SPL*. Проведохме количествен PCR анализ, който потвърждава експресионния профил на hrh-miR156a-5p и hrh-miR157-5p, установен първоначално чрез секвениране на малки РНКи. Констатирахме противоположен експресионен профил между тези микро РНКи и техните прицели в тъканите на засушени растения. Въз основа на получените резултати, предполагаме, че анализираните семейства miR156/157 и miR399 са важни за оцеляването на растенията при тежки засушавания, поради способността им да контролират развитието и растежа на растенията чрез модулиране на експресията на транскрипционни фактори (**Публикация 4**).

Супероксид дисмутазите (СОД) са основни ензими за защита срещу окислителни повреди, причинени от засушаване. Представихме резултати от клониране и характеризиране на гените от генното семейство на СОД в *Haberlea rhodopensis*. Седем копи ДНК с пълна дължина и техните частични геномни клонове получихме чрез комбинация от дегенеративен PCR, RT-PCR и RACE. Установихме аминокиселинни последователности, които показват много висока степен на сходство с цитозолни Cu,Zn-SODs (HrCSD2, HrCSD3), хлоропластни Cu,Zn-SODs (HrCSD5), други Cu,Zn-SODs (HrCSD4), Mn-SODs (HrMSD) и Fe-SOD (HrFSD). Една копи ДНК определихме, като псевдоген (HrCSD1). Установихме, че всички идентифицирани СОД гени се експресират на транскрипционно ниво. HrCSD2, HrCSD5, HrMSD и HrFSD са конститутивно експресирани във всички органи, докато HrCSD3 и HrCSD4 са органо-специфични. Открихме в значителни нива транскриптите на конститутивните SOD гени дори във въздушно сухи листа. Мултигенното семейство СОД на *H. rhodopensis* е първото изследвано от нас семейство СОД сред възкръсващите растителни видове. Констатираните високи нива на СОД транскрипти в напълно дехидратирани листни тъкани корелират със запазване на активността на СОД и със способността на растения от *H. rhodopensis* да възкръснат при рехидратация. Поради ендемичния реликтен характер на този вид, установените от нас данни биха могли да помогнат за по-нататъшно изясняване на еволюционните връзки между различни изоформи на СОД при различни растителни видове (**Публикация 14** и **Публикация 20**).

Тъй като генома на *Haberlea rhodopensis* не е секвениран все още, ние създадохме копи ДНК библиотека. От секвенираните 374 клона, 332 са обвързани с определена функция, а 42 са

отнесени към групата на секвенции без хомолози или ортолози. Установихме секвенциите на 40 регулаторни белтъка, като 18 от тях са подбрани, като база за разработване на сонди за последващ PCR анализ в реално време. Представените в пълна дължина копии ДНК клонове преведохме във форма, подходяща за последващо аотиране в БД NCBI (**Публикация 16**).

Вироидът на вретеновидността при картофените клубени (PSTVd) е една от най-малките патогенни РНКи, заразяващи растенията. PSTVd патогенността е сложен феномен, опосредстван от секвенционни и структурно-специфични характеристики на вироидните щамове, видово специфични геномни характеристики на гостоприемника, както и от взаимодействията между PSTVd и неговия гостоприемник в динамична среда. Изследвахме микро РНКи, реагиращи на вироиди и тяхната потенциална роля, като регулаторни детерминанти в патогенността на PSTVd при два сорта български пипер (*Capsicum annuum* L.): Джулунска шипка и Куртовска капия. В тези сортове, консервативни микро РНКи, като *cap-miR397*, *cap-miR398*, *cap-miR408* и *cap-miR482* показаха сортовоспецифична експресия при PSTVd инфекция на 28-ия ден след инокулация. Тези експресионни профили получихме от проведено секвениране на малки РНКи и валидирани след проведен количествен PCR в реално време. Нивото на експресия на *cap-miR397a-5p* е значително намалено при инфектиран с PSTVd сорт Джулунска шипка, за разлика от сорт Куртовска капия. Експресията на целевия на *cap-miR397a-5p* ген - *Laccase-like 4*, е пропорционално увеличена при 43-ия ден след инокулация, което предполага, че тази зависимост на микро РНК/иРНК е до голяма степен причина за чувствителността на сорт Джулунска шипка към PSTVd. Получените от нас резултати разкриват наличие на сортово-специфичен отговор на микро РНКи свързани с PSTVd инфекция в пипер. Задълбочава се познанието за функционалната роля на микро РНКите в регулаторни мрежи, които работят в PSTVd - пипер патосистемата (**Публикация 1** и **Публикация 17**).

Генетичното разнообразие, причинено от движение на транспозонни елементи, може да играе важна роля в адаптацията на растенията към заобикалящата ги среда. Придвижването на транспозоните може да причини възникването на алели, чрез включването им, или отпадането им, както от гени, така и от промоторни области. Идентифицирахме полиморфизми, свързани с инсерции/делеция (индел) на транспозонни елементи в 7 от 12-те локуса на промоторите в изследваните дванайсет екотипа на *Arabidopsis thaliana*. Те могат да се развият допълнително, като молекулярни маркери. Липсата на транспозонни елементи в промоторните области на ортоложните гени в *A. lyrata* показва, че вмъкването на тези транспозонни елементи в род *A. thaliana* е настъпило след разделянето му от *A. lyrata*. Анализът на секвенцията на промоторните региони на гените *CML41* (Calmodulin-like protein 41) и *CHAP* (chaperone protein dnaJ-related) потвърждава инделните полиморфни места в четири екотипа - Колумбия, Василевская, Шахдара и Пирин. Наблюдаваният от нас инделов полиморфизъм на *CHAP* промоторния регион е свързан със специфични профили на генна експресия в различните екотипове, отглеждани при нормална и висока температура (**Публикация 5**).

Заедно със съществената роля в поддържането на целостта на генома, включително транспозонната мобилност, метилирането на ДНК участва в регулацията на гени, важни за развитие на растенията и реакция на стресови въздействия. При растенията, процесът на метилиране на ДНК може да бъде насочен от малки РНКи в процес, известен като РНК-насочено-ДНК-метилиране (RdDM), включващ две специфични за растенията РНК полимеразы - PolIV и PolV. Резултатите получени от нас в **Публикация 10** демонстрират координирано

регулиране на DRM2 (Domains Rearranged Methyl-transferase 2), NRPD1 (DNA-directed RNA polymerase IV subunit 1) и NRPE1 (DNA-directed RNA polymerase V subunit 1) в отговор на висока температура и предполагат, че PolIV и/или PolV може да са необходими за индуцирането на DRM2 експресия при топлинен стрес. Потвърдихме, че експресията на ROS1 е потисната в мутанта, в който липсват активни PolIV и PolV, което може да е следствие от премахването на ДНК метилиране. Повишената експресия на гена *At3g50770*, кодиращ калмодулин подобен протеин, в отговор на повишена температура корелира с намалено ДНК метилиране на промотора, докато експресията на гена *At5g43260*, кодиращ чаперон, не показва обратна корелация между метилиране на промотора и експресия на гена. Получените от нас резултати показват също, че PolIV и/или PolV могат да регулират генната експресия при стресови условия не само чрез RdDM, но и като действат в други регулаторни процеси.

В **Публикация 27** - сборник с обзорни статии “Нанонауки и нанотехнологии”, запознаваме накратко учителите по природни науки с аспекти на връзката между нанотехнологиите и съвременните науки. В този материал подробно сме представили основните видове наноструктури, получени на базата на молекули на дезоксирибонуклеинови киселини, както и за методите на асемблирането им.

2) ДНК маркери и генотипиране

Сем. *Iridaceae* са добре дефинирано семейство от около 1800 вида и между 60 и 70 рода. Липсата на съвременни проучвания по отношение на хорологията, морфологията, таксономията и екологията на тази група висши цветни растения у нас са основание за провеждане на изследването в **Публикация 3**. Заедно с това видовете от сем. *Iridaceae* притежават ценни стопански качества, което провокира и практически интерес, тъй като те са едни от най-популярните декоративни видове в света и освен това имат медицинско приложение. Молекулярната идентификация и ДНК баркодирането е широко приложим таксономичен метод. Той може да се използва за идентифициране на видове, диференциране на родствени таксони или скрити таксони. Приложихме вътрешния транскрибируем спейсър регион на ядрената рибозомна ДНК (ITS) за идентификация и определяне на принадлежността на представители от сем. *Iridaceae*. Построихме филогенетично дърво, на основата на Bayesian алгоритъм. Резултатите, получени от нас показват, че анализираният от нас образци са с най-голямо филогенетично сходство с *C. adamioides* от Турция. Най-близкият роднина - *C. ranjeloviciorum* Kernd., се клъстерира и остава в близост до *C. adamioides*. Морфологични, анатомични и молекулярни анализи разкриват, че българската популация показва особена комбинация от признаци, характерни за *C. adamioides*.

Систематиката на род *Mentha* от семейство *Lamiaceae* е сложна. Поради високата си честота на полиплоидия, разнообразна морфология, висока степен на вариации на броя на хромозомите и междувидова хибридизация, род *Mentha* се счита за таксономично предизвикателство. Използването само на морфологични признаци е недостатъчно при разграничаване на различните видове мента. Проучихме ефективността на ISSR молекулните маркери за оценка на генетичната изменчивост в този род и направихме опит да се разграничат генотиповете в групата. Осемнадесет различни ISSR маркера тествахме върху пет български вида мента. Въз основа на молекулярните характеристики установихме ясно разпределение на генотиповете на построената дендрограма (**Публикация 9**). В допълнение клонирахме и секвенирахме

вътрешния транскрибируем спейсърен регион (ITS) 1 и 2 при три от видовете мента: *Mentha aquatic* L., *Mentha longifolia* L. (Huds) и *Mentha piperita* L. (**Публикация 8**). При филогенетичния анализ на всички осем вида *Mentha*, открити в българската флора тествахме приложимостта на ITS1 и ITS2 за молекулярни пръстови отпечатъци и проведехме по-нататъшни сравнителни изследвания, включително ново получените последователности на ITS1 и ITS2.

С помощта на редица молекулярни маркери оценихме и генетичното разнообразие и генетична свързаност в бадем (*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb). Идентифицирахме и нови сортове бадем. Потвърдихме, че традиционната зародишна плазма в областта Алгарве (Португалия) представлява важно хранилище на генетичното разнообразие. Проучвания вид притежава алели с голям селскостопански интерес (**Публикация 12**).

В **Публикации 19; 21; 22; 23 и 24** описваме анализи и проучвания с полския фасул (*Phaseolus vulgaris* L.). Приложили сме редица молекулярни техники и класически селекционни програми, за характеризиране и подобряване на редица български сортове фасул. Доказахме, че изследваните български сортове са обещаваща зародишна плазма и са подходящи за въвеждането им в схеми за хибридикационно размножаване, както и за прилагане на мутагенеза и биотехнологични подходи. С помощта на RAPD и ISSR техники установихме маркери в близост до гените *Fin* (тип на хабитуса) и *P* (цвят на семената), които могат да се използват за избор на някои нива на количествени признаци, свързани с гени в обикновения фасул.

Резултат от тази дългогодишна работа е признаването и включването в **Списък Б** на официалната сортова листа на страната по **чл. 14, ал. 3, том 2 от ЗПММ** нов сорт полски фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) от колектив с мое участие – **Пловдив 6М**.

3) Секвениране и аотиране на хлоропластни геноми

Нашата изследователска група е секвенирала, асемблирала и аотирала хлоропластния геном на *H. rhodopensis*. Проведохме сравнителен анализ с наличните хлоропластни геноми на близкородствени видове. Структурата на генома, подредбата на гените, съдържанието на GC и смисъла на кодоните са подобни на типичните хлоропластни геноми при покритосеменните растения. Хлоропластния геном на *H. rhodopensis* съдържа 137 гена, представляващи 70,66% от целия геном, който включва 86 протеин кодиращи гени, 36 тРНК и 4 рРНК. Сравнителен анализ на хлоропластния геном с други тясно свързани представители на *Lamiales* разкри консервативен генен порядък в IRs и LSC/SSC регионите. Филогенетичен анализ, базиран на гени, кодиращи протеини от 33 растителни вида, определя вида, като представител на семейство *Gesneriaceae*. От еволюционна гледна точка, проведен от нас сайт специфичен селекционен анализ детектира положително селектирани сайтове в 17 гена, повечето от които участват във фотосинтезата (*rbcL*, *ndhF*, *accD*, *atpE* и др.). Наблюдаваните кодонни замествания могат да се интерпретират, като последица от молекулярната адаптация към засушаване, което осигурява еволюционно предимство на *H. rhodopensis* (**Публикация 7**).

4) Молекулярна екология

Установихме, че органичното и неорганичното замърсяване води до съответни разлики в молекулярните, химичните и микроморфологичните маркери на изворния мъх *Fontinalis antipyretica*. Подтиснатата експресия на голямата субединица на рибулоза-1,5-бисфосфат карбоксилаза (*rbcL*) отчетохме при две от пробите, поставени във води, замърсени с тежки метали. Получените резултати показват, че експресията на гена *rbcL* е един от обещаващите индикатор за биомониторинга (**Публикация 2**).

Микроорганизмите, обитаващи сладководна среда, са неразделна част от водните екосистеми. Налични са много малко данни относно профилите на микробните съобщества в язовирите в България, въпреки ключовата им роля в биогеохимичните процеси. Ние проведохме първия изчерпателен метагеномен анализ на планктонното бактериално разнообразие на два големи и икономически важни български язовира - Батак и Цанков камък, чрез секвениране от следващо поколение на 16S рибозомния РНК ген. Получените от нас данни могат да допринесат за по-доброто систематично разбиране на микробното разнообразие на сладководната среда (**Публикация 6**).

Влиянието на синтетичния пиретроиден инсектицид Lambda 5ЕК върху митотичното клетъчно делене и хромозомния статус показаха, че тестваните от нас видове: *Capsicum annuum* L., *Beta vulgaris* L. и *Allium cepa* L. имат различна чувствителност към пестицидното действие. При третиране с 0,003% разтвор на пестицида, не установихме хромозомни аберации в *Beta vulgaris* L. (**Публикация 15**). Резултатите предполагат, че цвеклото притежава известна издръжливост на мутагенното действие на инсектицида и вероятно е подходяща култура в сеитбооборота в селскостопанската практика, когато се използват ламбда-цихалотринови пестициди.

За увеличаване на генетичното разнообразие при културните растения се използва химичен и физичен мутагенез, което е довело до създаване на много нови сортове. Сред химичните мутагени етил метан сулфонатът (EMS) е от доказано най-мощните. В **Публикация 18** описваме прилагането на EMS върху семена от *Paulownia tomentosa*. Впоследствие проследихме фенотипните промени в полученото мутантно поколение (M1). Идентифицирахме растение с фенотип подобен на джуджевидно растение – с нарушена апикална доминантност, множество странични разклонения, листа с намален размер и скъсени междувъзлия. Третирани с гиберелинови киселини (GA3), джуджевидните растения удължиха стъблата си, но останаха с разклонени стъбла и по-малки листа. При прилагане от нас на ауксините Indole-3-acetic acid (IAA) и 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), джуджевидният фенотип не се промени. Джуджевидни растения култивирани *in vivo* и пръскани с епибрасиностероиди (EBR), не показаха промяна в своя фенотип, но такива растения, култивирани *in vitro* на среда с EBR имат удължени междувъзлия, листа с нормален размер и остават без разклонения. Джуджевидният фенотип може да бъде свързан с недостига на брасиностероиди, като резултат на понижена биосинтаза или променена регулацията на други гени свързани с брасиностероидите.

Съвременният живот е невъзможен без продукти, получени с помощта на техниките, използвани в класическата съвременна биотехнология. Мащабното производство на биотехнологични изделия, обаче открива дискусия за икономическото въздействие, управлението на отпадъците, биобезопасността и биоетичните проблеми. Растителното молекулярно земеделие предлага сравнително евтина опция за добив на много ценни продукти и демонстрира редица предимства пред класическите технологии, но също така повдига

въпросите за по-нататъшни перспективи за развитие, идентифициране на опасностите и оценка на риска. В **Публикация 13** правим обзор върху предлаганите възможности и предизвикателствата, пред които са изправени съвременните системи за растително молекулярно земеделие.

5) Приноси в областта на учебната дейност.

Представяме две учебни помагала (**Трудове №28 и №29**) за практически занятия съответно по Биоинформатика и Генно инженерство, предназначени за студенти от различни биологични специалности на Пловдивски университет “Паисий Хилендарски”. Те са съобразени с учебната програма на студентите и броя учебни часове, но може да се използват и от студенти по различни биологични направления и сродни специалности от други висши учебни заведения.

В учебното помагало “Ръководство по Биоинформатика” разглеждаме теоретично и се демонстрират на практика бази данни за нуклеотидни секвенции и протеинови секвенции, специализирани бази данни, сравняване на двойка секвенции (pairwise alignment), сравняване на множество секвенции (multiple alignment), търсене на хомоложни секвенции в бази данни, както и изграждане на филогенетични дървета.

Учебното помагало “Практикум по Генно инженерство” запознава студентите и ги подготвя за работа с методи и техники, използвани за провеждане на бактериална трансформация, за установяване и доказване на трансформирани с GFP (green fluorescent protein) бактериални клонове - изолиране, хроматографско пречистване и електрофоретично разделяне на GFP, както и Полимеразна Верижна Реакция (PCR) за идентифициране на рекомбинантния плазмид pGLO, носещ GFP.



гр. Пловдив,
2021 г.

Изготвил:

/гл. ас. д-р Елена Апостолова-Кузова/