

## Становище

върху дисертационен труд за придобиване на научната степен "Доктор на науките" по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Генетика"

**Автор на дисертационния труд:** доц. д-р Анелия Венева Янчева от АгроБиоИнститут, ССА.

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

**Член на научното жури:** проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева, съгласно заповед № РД 05-156/02.08.2019 г. от Председателя на ССА.

Академичното развитие на доц. Анелия Янчева започва в АБИ като докторант през 1996г. Ръководител е на международни (два от които по Хоризонт 2020) и български проекти, основен организатор на научно експерименталната работа в направление Функционална Генетика Бобови, научен ръководител на трима защитили докторанти, член на НС по „ЗФТК“ на ССА, на ИС на ФНИ. Приложените документи във връзка със защитата показват, че процедурата е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и правилника за неговото приложение.

Темата на дисертационния труд е актуална и напълно отговаря на научната специалност. Дисертационният труд на доц. Янчева е съвременно научно изследване посветено на ролята на моделни видове в изследванията по растителна биотехнология и функционална геномика на Бобови. Уникалната способност на бобовите растения да влизат в симбиоза с азот фиксиращи бактерии ги прави незаменими в селскостопанската практика за ротация на културите, значително подобрява органичното съдържание на азот в почвата и ограничава прилагането на химически азотни торове, което води до замърсяване на почвите и водите. 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*, а създаването на трансгенни растения с модифицирана експресия, простата организация на генома, късия жизнен цикъл, лесно култивиране в лабораторни условия и наличието на множество генетични и геномни инструменти, разработени за тях, ги прави ценни за транслационната биология, чиято основна цел е подобряване на селскостопански култури с икономическо значение.

Дисертационният труд е написан на 315 страници и е структуриран по класическия начин с необходимия баланс между основните части. Литературният обзор включва 501 източника и демонстрира отличната теоретична подготовка и литературна осведоменост на доц. Янчева, написан в стил, който го прави лесен за възприемане дори от неспециалисти в областта. Представените в литературния обзор анализи и обобщения я характеризират като зрял и ерудиран изследовател. Резултатите от изследванията са обобщени в 23 таблици и 71 фигури с много добро качество в

основния текст и две приложения с допълнителни 2 таблици и 27 фигури, включително конструктори и секвенции.

Целта на настоящия дисертационен труд е ясно формулирана, като за реализирането ѝ са поставени 10 задачи, използвани са класически и съвременни молекулярни методи.

Описаните експерименти са основа за повторяемост и възпроизводимост на резултатите, което се потвърждава от прилагането на разработената система за *Tnt1* инсерционен мутагенез за *M. truncatula* при второто моделно растение *Lotus japonicus*.

Получените резултати са отразени в 13 публикации в реномирани международни списания с импакт фактор и цитирани основно от чуждестранни автори.

Представеният автореферат отговаря напълно на резултатите и приносите в дисертационния труд.

Научните изследвания на доц. Янчева, представени в дисертационния труд са в областта на: растителната регенерация (разработени са ефективни и оригинални протоколи за регенерация чрез директен и индиректен соматичен ембриогенез; генетична трансформация за проследяване процеса на развитие от една клетка до цяло растение); разработване на системи за генен пренос (произход на трансгенните растения от единични трансформирани клетки); инсерционен мутагенез (инсерционни мутантни линии за идентифициране на ключови гени от растителното развитие и проучване ролята им във функционирането на целия растителен организъм); функционална и сравнителна геномика (разработване на система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при *L. japonicus* и създаване на малка колекция от инсерционни мутантни линии). Ключови гени, отговорни за растителното развитие, процеса на азотфиксация и вторично коренообразуване, както и участващи в сигналните каскади и растителната защита са клонирани и прехвърлени в генома на моделните видове *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana*, с цел проучване на функцията им. 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 *M. truncatula* и *A. thaliana* във връзка със специфичната му функция в синтеза на разклонената аминокиселина левцин, както и ролята му в растителния клетъчен цикъл.

Актуалността на разработваната тема в дисертационния труд определя значимостта на получените приноси, които са с фундаментален и научно приложен характер:

1. Охарактеризиран е процеса на формиране на ДСЕ в клетъчни култури от *M. truncatula* и *M. falcata* от клетка до цяло растение.
2. За първи път е изследван размера на генома на диплоидни видове от род *Medicago* с произход от Алижир, установена е връзка 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 *L. 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, 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 Fbox белтък в моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana* включващо фенотипни, морфометрични, транскриптомни, протеомни и метаболомни анализи.
8. Създаден е ефективен протокол за генетична трансформация на суспендиални култури от *M. truncatula*, при който се регенерират стабилни трансгенни растения от единични клетки с цел анализи на клетъчно и субклетъчно ниво.
9. Разработена е система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета за изследвания на клетъчния цикъл при *M. truncatula*.

### Заклучение:

Дисертационният труд напълно отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ и правилниците на ССА и АБИ за неговото приложение, има всички достойнства да бъде оценен високо, което ми дава основание убедено да гласувам положително и да препоръчам на почитаемото Научно жури да подкрепи присъждането на научна степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Генетика“ на доц. д-р Анелия Венева Янчева.

02.10.2019 г.  
София

Изготвил становището:   
(проф. д-р Венета Капчина-Тотева)

## SCIENTIFIC OPINION

on dissertation for obtaining the degree of "Doctor of Science" in Professional field 4.3., Biological Sciences, Scientific speciality "Genetics"

**Author of the dissertation:** Assoc. Prof. Anelia Veneva Iancheva from AgroBioInstitute, Agricultural Academy

**Thesis topic:** The role of model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* in plant biotechnology and functional genomics studies of legumes.

**Member of the Scientific Jury:** Prof. Dr. Veneta Mihova Kapchina-Toteva, according to Order No. RD 05-156 / 02.08.2019 by the President of the Agricultural Academy

The academic development of Assoc. Prof. Anelia Iancheva started at the AgroBioInstitute as a PhD in 1997. She is the head of international and Bulgarian projects (two of which under Horizon 2020), the main organizer of the scientific-experimental work in the field of Functional Genetics Legumes, scientific leader of three PhD students, member of Scientific Advisory Board "Cereals, Forage and Technical Crops", Former member of the Executive Board of the BNSF. The attached documents related to the thesis show that the procedure has been followed and the documentation has been prepared in accordance with the requirements of the ZRASRB / Law on the Development of the Academic Staff in the Republic Bulgaria/ and the Rules for its implementation.

The topic of the dissertation is relevant and fully corresponds to the scientific specialty. Assoc. Prof. Iancheva's dissertation is a modern scientific study devoted to the role of model species in the research on plant biotechnology and functional genomics of *Legumes*. The unique ability of legumes to enter into symbiosis with nitrogen-fixing bacteria makes them indispensable in agricultural crop rotation practices, significantly improves organic nitrogen content in soil and limits the application of chemical nitrogen fertilizers, leading to soil and water contamination. Key genes responsible for plant development and the nitrogen fixation process have been cloned and transferred into the genome of the model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*, and the creation of transgenic plants with modified expression, simple genome organization, short life cycle, easy cultivation laboratory conditions, and the presence of many genetic and genomic tools designed for them, makes them valuable for translational biology, whose main purpose is to improve crops of economic importance.

The dissertation is written on 315 pages and is structured in the classic way with the necessary balance between the main parts. The literature review includes 501 sources and demonstrates the excellent theoretical background and literary awareness of Assoc. Prof. Iancheva, written in a style that makes it easy to perceive even by non-specialists in the field. The analyses and summaries presented in the literature review characterize her as a mature and erudite researcher. The research results are summarized in 23 tables and 71 figures of very good quality in the main text and two applications with additional 2 tables and 27 figures, including constructs and sequences.

The purpose of this dissertation is clearly formulated, with 10 tasks set for its implementation, using classical and modern molecular methods.

The experiments described are the basis for the repeatability and reproducibility of the results, which is confirmed by the application of the developed *Tnt1* insertion mutagenesis system for *M. truncatula* to the second model plant *L. japonicus*.

The results obtained are reflected in 13 publications in reputable international journals with impact factor and cited mainly by foreign authors.

The abstract presented is fully consistent with the results and contributions to the dissertation.

Assoc. Prof. Iantcheva's research presented in the dissertation is in the field of: plant regeneration (effective and original protocols for regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis have been developed; genetic transformation to track the process of development from one cell to the whole plant); of gene transfer systems (origin of transgenic plants from single transformed cells); insertional mutagenesis (insertion mutant lines for identifying key plant development genes and examine their role in the functioning of the entire plant organism); functional and comparative genomics (development of a system for *Tnt1* insertion mutagenesis in *L. japonicus* and creation of a small collection of insertional mutant lines). Key genes responsible for plant development, nitrogen fixation and secondary root formation, as well as involved in signalling cascades and plant protection, were cloned and transferred into the genome of model species *M. truncatula*, *L. japonicus* and *A. thaliana*, to study their function. For six of the studied genes, their involvement in different stages of the process of indirect somatic embryogenesis in *M. truncatula* was demonstrated for the first time after monitoring the expression of the GUS marker gene under the control of their endogenous promoters. The dissertation presents a detailed comparative study on functional genomics of the gene encoding the F-box protein of the genome of *M. truncatula* and *A. thaliana* in relation to its specific function in the synthesis of the branched amino acid leucine, as well as its role in the plant cell cycle.

The relevance of the topic developed in the dissertation determines the importance of the contributions received, which are of fundamental and scientifically applied character:

1. The process of formation of direct somatic embryogenesis (DSE) in cell cultures of *M. truncatula* and *M. falcata* from cell to whole plant is characterized.
2. The genome size of species of genera *Medicago* originated from Algeria was examined for the first time, and a link between genome size and the competence to induce DSE in a liquid medium was established.
3. A collection of *Tnt1* insertional mutant lines was created for *M. truncatula* cv. Jemalong through efficient transposition protocols.
4. A small collection of *Tnt1* insertional mutant lines for the second model species *L. japonicus* has been developed.
5. For the first time, a new retro-element *MERE1-1* has been identified in the genome of *M. truncatula* mutant lines which is transposed during *in vitro* regeneration.
6. An original insertion mutant line called "Fishbone" was discovered after phenotypic characterization, and *Tnt1* and *MERE1-1* inserts were sequenced.

7. For the first time, a comparative functional study of a gene encoding F-box protein in model plants *M. truncatula* and *A. thaliana* including phenotypic, morphometric, transcriptomic, proteomic and metabolomic analyses was performed.

8. An effective protocol for the genetic transformation of suspension cultures of *M. truncatula* has been established and stable transgenic plants were regenerated from single cell. The protocol is applicable for analyses on cellular and subcellular level.

9. A system for synchronization of meristem cells from root tips for cell cycle studies in *M. truncatula* has been developed.

**Conclusion:**

The dissertation fully meets all the requirements of the ZRASRB and the rules of the Agricultural Academy for its application, has all the merits of being highly appreciated, which gives me a reason to vote positively and to recommend to the Honourable Scientific Jury to award Assoc. Prof. Anelia Veneva Iancheva a scientific degree "Doctor of Science" in the Professional field 4.3. Biological Sciences, Scientific specialty "Genetics".

02.10.2019

Sofia

Drafted the Scientific opinion

(Prof. Dr. Veneta Kapchina-Toteva)