

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Любомир Манолов Стоилов, Институт по физиология на растенията и генетика (ИФРГ) – БАН, относно дисертационен труд за придобиване на научната степен „Доктор на науките, научна област 4 Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Генетика, шифър 01.06.06.

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

Автор: доц. д-р Анелия Венева Янчева, отдел Функционална Генетика, АгроБиоИнститут, ССА.

Със заповед на председателя на ССА № РД05-156 от 02.08.2019 г. съм назначен за външен член на научното жури за провеждане на защита за присъждане на научната степен „доктор на науките“ на тема „Роля на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana* в изследванията по растителна биотехнология и функционална геномика на Бобови“. Дисертационната теза е разработена от доцент д-р Анелия Велева Янчева от отдел Функционална Генетика, АгроБиоИнститут, ССА. В тази връзка ми е предоставена документация, включваща визираната заповед, протокол от предварителното обсъждане на дисертационния труд пред първичното научно звено (Агробиоинститут), копие от дипломата за образователната и научна степен „доктор“ на дисертантката, автобиография в европейски формат, публикациите, свързани с дисертационния труд в pdf формат, както и авторска справка за научните и научно-приложни приноси на дисертацията. Прегледът на представената актуална справка за съответствие с минималните национални изисквания и изискванията на правилника на ССА за придобиване на научна степен „доктор на науките“ за съответната научна област и професионално направление показва, че доц. д-р Анелия Венева Янчева отговаря изцяло на заложените в тези нормативни документи изисквания и наукометрични критерии за тази научна степен.

Практически цялата си професионална дейност доц. Анелия Янчева е реализирала в Агробиоинститута при ССА, започвайки като докторант след придобиването на

магистърска степен в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, катедра Ботаника, като понастоящем ръководи отдел Функционална генетика Бобови при института. В кариерното развитие на доц. Янчева прави впечатление ръководството и участието в голям брой международни (включително и рамковите програми на ЕС) и национални проекти, поредицата нейни специализации в престижни европейски научни институции, работещи в областта на растителната биология и геномика, участията в редица престижни международни конгреси и конференции, както и в организирането и провеждането на международни практически курсове и програми. Доцент Анелия Янчева е била член на ИС на ФНИ, представляващ селскостопански науки, както и научен ръководител на трима защитили докторанти.

Подготвеният от доц. Янчева дисертационен труд, представен на 315 стандартни страници, е изграден по класическата за такъв тип дисертационни тези схема – увод, литературен преглед, цел и задачи, материал и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи и приноси, цитирана литература (501 заглавия на латиница), както и списък на публикациите (13 заглавия, всички на английски език), включени в дисертацията. Дисертацията съдържа и две приложения с допълнителни материали, съдържащи схеми, секвенционна информация, снимков материал, методологични подходи, използвани праймери, схеми на векторни конструкти – информация, добре онагледяваща и допълваща получените резултати. Този подход с използване на приложения смятам за много удачен и продуктивен. Бих искал да отбележа, че като цяло илюстративният материал, включен в дисертацията, е с много високо качество и с изключително внимание към детайла и съответния информационен товар, което значително улеснява възприемането и трактовката на получените данни.

Дисертационният труд на доц. Янчева представлява съвременна разработка в една много актуална и бурно развиваща се през последните години област на сравнителната и функционална геномика на висшите растения, базирана на използване на моделни видове с вече секвенирани геноми като ефективни системи за оценка на функцията на гените, регулацията на тяхната експресия и съответните генни продукти чрез използване на интегрирани методологични платформи, включващи транскриптомни, протеомни и метаболомни подходи. Що се отнася до функционалната геномика и биотехнология на бобовите, едногодишната люцерна *Medicago truncatula* е общопризнат и широко използван модел за изследвания върху процесите на азотфиксация, а наличието на спектър от мутантни линии способства за изясняване на

функцията на гените и фенотипните им проявления. В хода на изследванията са използвани и други 2 моделни вида – още един представител на семейство Бобови *Lotus japonicus*, както и общопризнатият и широко използван моделен обект в растителната биология – *Arabidopsis thaliana*. Включването им в хода на изследванията е напълно оправдано, тъй като *L. japonicus* се утвърди като моделно растение за геномни изследвания при бобовите основно във връзка с ризобиалния и микоризен симбиозис, като предимство е и малкият геном (около 470 Mb) и относително късият жизнен цикъл. Що се отнася до *Arabidopsis thaliana*, като първото растение с изцяло секвениран геном и относително лесна процедура за генетична трансформация, базирана на *Agrobacterium tumefaciens*, след средата на 80-те години то се превърна в универсален модел за мащабни изследвания в областта на растителната биология, генетика и геномика.

Основната цел на дисертационния труд, формулирана от дисертантката, е да „утвърди ролята на моделните бобови растения *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и моделното растение *Arabidopsis thaliana* в съвременните изследвания по растителни биотехнологии, сравнителна и функционална геномика и значимостта им при разбиране растителната биология на бобови“. Тук бих отбелязал, че *Arabidopsis thaliana* е априори утвърден модел в такъв род проучвания, и вероятно се визира приложението на съвкупността от тези три моделни вида в контекста на изследванията по функционална геномика на бобовите и създаването на тази база на съвременна и с висока разрешителна способност технологична платформа за геномни и биотехнологични изследвания, свързана и с ефективното използване на бобовите култури в съвременната агобиологична теория и практика.

Така формулираната цел детерминира в значителна степен и структурата и съдържанието на литературния преглед, в който аналитично, изчерпателно и компетентно е представено и подложено на критичен анализ съвременното състояние на редица ключови за съвременната геномика и биотехнология на бобовите култури въпроси като избор на подходящи моделни растения, растителна регенерация чрез соматичен ембриогенез, соматклонално вариране, генетична трансформация, подвижни генетични елементи и инсерционен мутагенез, права и обратна генетика, както и геномни, протеомни и метаболомни аспекти на функционалната им геномика. Според мен обзорът и дисертацията като цяло биха спечелили от известно разширяване на финалния абзац, посветен на потенциала за трансфер на познания от функционалната геномика на моделните растения към културните представители на семейството.

Въз основа на формулираната основна цел, която възприемам и като ключова дисертационна теза, са формулирани 10 експериментални задачи, като десетата е детайлизирана в 6 подзадачи. Прегледът им показва, че някои от задачите биха били още по-информативни, ако се прецизират формулировките им - например при задачи 8 и 9 не е визирано кои са „изследваните гени“, както и тази на задача 10, където „извършването“ на анализи би могло да се пропусне. Като цяло приемам логиката и последователността на формулировките им.

Значима част от дисертацията заема раздел Материал и методи. На повече от 40 страници са изложени в необходимия детайл и с компетентност и прецизност експерименталните процедури и протоколи, прилагани в хода на изследванията, като изложението е съобразено с естеството и последователността на провеждането им. В това отношение добро впечатление прави схематичното представяне на използваните материали и методи, включено в автореферата, от което личи много ясно вътрешната логика и взаимовръзката на индивидуалните експериментални подходи. Дисертацията само би спечелила, ако тази схема беше и неин компонент. Информационният товар, структурата, вниманието към детайла и онагледяването на този раздел го превръщат в едно съвременно и на високо методично ниво практическо ръководство по функционална геномика и биотехнология на бобовите.

Големият обем на експерименталните данни обосновано е наложило обединяването на разделите резултати и обсъждане в едно цяло. Като структура и последователност на представяне изложението на този най-обширен раздел от дисертацията (около 150 страници) е подчинено до голяма степен на логиката на проблемите, визирани и в литературния преглед, което допълнително допринася за кохерентността на разработваната дисертационна теза. Много добро впечатление прави стремежът да бъде отчетливо представена проектната свързаност и обезпеченост на проведените изследвания, както и ролята и значението на съответните проекти за проблематиката на групата по функционална геномика на бобовите и на Агробиоинститута като цяло. Това е рядко срещана практика в област, където по принцип изследванията са изключително колективно усилие, още повече, че някои от получените в дисертацията резултати са плод на много успешна колаборация с водещи европейски лаборатории в областта на геномиката. Тук бих отбелязал и прецизното отношение към терминологията и към трислитерацията и от английски в дисертационния труд като цяло. Вероятно поради естеството на представените данни, някои резултати, представящи и интерпретиращи различни протоколи за генетична трансформация, например, са доста обременени с

методологична информация, която би могла да е компонент от материал и методи или на съответните приложения. В известен дисонанс с много високото качество на илюстративния материал като цяло, легендите на фиг. 12, 13, 14 и 15, характеризиращи чрез IRCR анализ и транспозон дисплей мутантните линии *M. Truncatula* с *Tnt1* инсерти, получени по различни протоколи, не са достатъчно информативни.

Въз основа на получените в хода на дисертационната разработка експериментални данни са оформени 16 извода. Сред тях се откроява разработването на ефективни системи за инсерционен мутагенез на базата на ретротранспозона *Tnt1* при *M. truncatula* и *Lotus japonicus*, като е идентифициран нов ретроелемент MERE1-1 с доказана транспозиция в геномите на мутантни линии *Medicago truncatula* и установен размер на генома при диплоидни представители на този род, конструирани са вектори с модулирана експресия и анализ на промоторната активност на гените *MtLAX3*; *MtARFB3*; *MtF-box*; *MtHAC*; *MtGRAS*; *MtDRP*, подбрани въз основа на инкорпорирането на *Tnt1* ретротрансоzona в екзоните на тези гени, получени са хомозиготни трансгенни растения със свръхекспресия и подтисната експресия на гена, кодиращ F-box белтък (медиатор на белтък-белтъчните взаимодействия с важна роля при РНК-опосредстваното генно мълчание и развитието на растенията) при *A. thaliana*, изследвана е активността на маркерните гени GUS и GFP и е локализирана експресията на гена кодиращ F-box белтък в тъкани и органи на трансгенни растения от *M. truncatula* и *A. thaliana*, установена е активност на този ген в хода на клетъчния цикъл при *M. truncatula* и *A. thaliana*, и не на последно място чрез т.н. тандемно афинитетно прочистване е идентифициран общ интерактор на гена, кодиращ F-box белтък и е определен експресионният му профил в трансгенни растения *M. truncatula* и *A. thaliana* с модифицирана експресия. Според мен формулировките на някои от изводите са разточителни и биха могли да бъдат представени по-стегнато и в по-малък брой, без от това да страда, както обобщаващият им характер, така и информативността им.

Дисертантката е формулирала в представения автореферат като краен резултат от своята работа 7 приноса с фундаментална насоченост и 2 приноса с научно-приложно естество. Сред тях се открояват със своя приоритетен характер изследванията върху размера на генома на диплоидни представители от род *Medicago* с Алжирски произход, като е установена корелацията между размера на генома и потенциала за индукция на директен соматичен ембриогенез в течна среда. От иновативно естество са и данните за наличието на ретроелемент MERE1-1 в генома на мутантни линии *M. truncatula*, който

се транспозира по време на регенерация *in vitro*, както и детекцията на инсерционна мутантна линия с фенотипна характеристика „Рибена кост“. Висока оценка заслужават и данните от комплексните функционални изследвания на гена кодиращ F-box белтъка, базирани на фенотипни, морфометрични и разнообразни геномни, протеомни и метаболомни подходи. Създадена е ценна колекция от *Tnt1* инсерционни мутантни линии при *M. truncatula* cv. Jemalong чрез протоколи за ефективна транспозиция, както и малка колекция от *Tnt1* инсерционни мутантни линии при *Lotus japonicus*. Тук бих добавил и включването на *Tnt1* мутанти, създадени в АБИ, в международната база данни „Samuel Roberts Noble Foundation“. Приносите с научно-приложна стойност се изразяват основно в създаването на експериментален протокол за генетична трансформация на клетъчни суспендиални култури, водещ до получаването на стабилни трансгенни растения от *M. truncatula*, както и в разработката на ефективна система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета в контекста на изследванията върху клетъчния цикъл при *Medicago truncatula*.

Към дисертацията имам и някои забележки извън визираните досега, които не снижават достойнствата и. В списъка на използваните съкращения както RNAi линии, така и amiRNA линии са маркирани принципно правилно като линии с подтисната експресия, но за amiRNA по-точно би било да се използва определението “изкуствено трансформирани” (artificially transformed). От представения списък на публикациите, включени в дисертационния труд, не личи импакт-факторът на статиите, които имат този рейтинг, а редица от тях като Plant Physiology (IF 5.949), Plant Cell Reports (IF 2.989) са с впечатляващи показатели в това отношение. Съществува известно разминаване между броя на формулираните научни и научно-приложни приноси, отразени в автореферата и включената самостоятелно в документацията на дисертацията справка за научно-приложните приноси. Що се отнася до приложенията, избраната схема на описание на включените материали в началото на всяко приложение е доста лаконична и в някои случаи кореспонденцията със съответните данни е затруднена. Дисертацията определено би спечелила и от известно разширяване на заключителния раздел, както по отношение на трактовката на съвкупността от получената информация за трите моделни вида като елементи на един ефективен експериментален подход в съвременната пост-геномна ера, така и относно потенциала за успешното му екстраполиране и за представители на други културни растения от семейство Бобови.

Заклучение

Представената от доц. д-р Анелия Янчева дисертационна разработка отговаря изцяло, както по форма, така и по съдържание на изискванията и наукометричните критерии на ЗРАС и на Правилника за приложението му, както и на правилника на Селскостопанска Академия за придобиване на научната степен „Доктор на науките” в РБ. Авторефератът отразява изчерпателно най-важните акценти от дисертационния труд и принципно го приемам като структура и съдържание. Съгласен съм и с формулираните от дисертантката научни и научно-приложни приноси. Получените експериментални данни и тяхната интерпретация показват, че поставената в дисертацията основна цел - да се извърши комплексна оценка на прилагането на съвкупността от моделните растителни видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana* в контекста на съвременната функционална геномика и биотехнологията на бобовите култури - е реализирана успешно. Престижните издания, в които са публикувани основната част от експерименталните резултати, включени в дисертационния труд, авторитетни международни списания с висок импакт рейтинг, както и като глави от книги на издатели като Springer и Noble Research Institute показват, че получените знания и интерпретацията им се радват на широко международно признание от научната общност, работеща в областта на растителната геномика и биотехнология. В своята съвкупност дисертацията на доц. Анелия Янчева представлява съвременна и иновативна разработка с наднационални измерения и доказани приноси, както за теорията, така и за практиката на изследванията по геномика, генетика, молекулярна биология и биотехнология на азотфиксиращите растения с реален потенциал за успешен трансфер на получените знания и при други културни растения от семейство Бобови със стопанска значимост. Въз основа на всички изложени дотук аргументи препоръчвам напълно убедено на Уважаемото Научно жури да присъди научната степен „Доктор на науките” на доц. д-р Анелия Венева Янчева от Агробиоинститут, СА, в професионално направление 4.3 „Биологични науки”, научна специалност „Генетика”, шифър 01.06.06.

30.09.2019г.


/проф. д-р Любомир Стоилов/

REVIEW

from Prof. Lubomir Manolov Stoilov, PhD, Institute of Plant Physiology and Genetics (IPPG), Bulgarian Academy of Sciences (BAS), on Thesis for obtaining a scientific degree “doctor of science”, Scientific area 4 “Natural sciences, mathematics and informatics”, Professional field 4.3 Biological sciences, Scientific specialty “Genetics”, code 01.06.06.

Title of the Thesis: Role of the model plants *Medicago truncatula*, *Lotus japonicas* and *Arabidopsis thaliana* for the studies on plant biotechnology and functional genetics of Legumes

Author: Assoc. Prof. Anelia Veneva Yantcheva, PhD, Department “Functional Genetics” AgroBioInstitute, Agricultural Academy

According to order of the President of the Agricultural Academy № RD 05-156 from 02.08.2019 I have been appointed as an external member of the academic board for obtaining academic degree „doctor of science“ entitled “Role of the model plants *Medicago truncatula*, *Lotus japonicas* and *Arabidopsis thaliana* for the studies on plant biotechnology and functional genetics of Legumes”. The thesis is developed by Assoc Prof. Anelia Veneva Yantcheva, PhD, Department “Functional Genetics”, AgroBioInstitute, Agricultural Academy. The respective documentation has been provided to me, including above order, protocol from the preliminary discussion of this dissertation with the members of primary scientific unit (AgroBioInstitute), copy of the diploma for the educational and scientific degree PhD of the applicant, European format CV, list of publications related to the Thesis as well as self-assessment record of the scientific and applied contributions of this study.

The provided up to date verification for conformity with the minimal National requirements as well as that of the respective regulations of the Agricultural Academy for obtaining a scientific degree “doctor of science” for the respective scientific area and professional field reveals that Assoc. Prof. Anelia Yantcheva is completely adequate to all requirements and criteria for this academic degree.

All professional career of Dr. Anelia Yantcheva has been realized at the AgroBioInstitute, starting as a PhD student after master graduation at Biological Faculty of Sofia State University, Department of Botany. At present she is a head of the division “Functional genetics of Legumes at this institute. In her career development it is worth mentioning leading

and participation in a number of international (including European framework programs) and national projects, a number of scientific visits and training at respected European scientific entities working in the field of plant biology and genomics, participation in a list of national and international scientific congresses and conferences, as well as organization and implementation of international courses and programs. Assoc. Prof. Anelia Yantcheva has been appointed as a member of the executive council of the Bulgarian National Science Fund as a representative for agricultural sciences. She has been also a supervisor of 3 successful PhD students.

Thesis elaboration of Dr. Yantcheva comprises 315 pages and is built on a classical scheme for such a study, namely introduction, literature survey, general and specific purposes, materials and methods, results and discussion, conclusions and contributions, literature cited (501 papers), as well as a list of publications (13 papers in English), included into the dissertation. There are also 3 supplements containing schemes, sequence information, pictures, methodological approaches, primer sequence information, schemes of the vector constructs - data visualizing and complementing the results presented. Such an approach, which is relatively rare, I consider very fruitful and appropriate. It is worth to mention also that the illustration of the dissertation is of high quality and with peculiar attention to every detail which significantly facilitates apprehension and discussion of the data obtained.

The Thesis of Dr. Yantcheva is an up to date study in one of the most exciting and fast developing areas of comparative and functional genomics of higher plants, based on utilization of model species with already sequenced genomes as an effective tool for evaluation of gene functions, regulation of their expression and respective gene products by application of integrated methodological platforms based on transcriptome, proteome and metabolome approaches. As about the functional genomics and biotechnology of Legumes, *Medicago truncatula* is an established and widely applied model for studies on nitrogen fixation and the existence of variety of mutant forms contributes towards better elucidation of the respective gene functions and their phenotypic manifestation. In the course of the study 2 other model species are also utilized – another representative of Fabaceae family *Lotus japonicus*, as well as the well-known and widely used model in plant biology *Arabidopsis thaliana*. Their use in the course of this study is fully justified as *L. japonicus* has been established as a model plant for genomic studies in Legumes mainly due to the rhizobial symbiosis, small genome (about 470 Mb) and the relatively short life cycle. As about *Arabidopsis thaliana*, as a first plant with completely sequenced genome and relatively simple

procedure for genetic transformation based on a phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, after the mid-80s it became universal model for a large-scale investigations in the field of plant biology, genetics and genomics.

The overall thesis objective is to “confirm the role of the model legume plants *Medicago truncatula* and *Lotus japonicas* as well as the model plant *Arabidopsis thaliana* in contemporary investigations in the area of plant biotechnology, comparative and functional genomics and their significance for understanding of legumes plant biology”. I would mention that *Arabidopsis thaliana* is a priori an established model for such type of studies and most probably the focus is on the application of a whole set of this 3 model species for studies on legume functional genomics. Based on this an establishment of up to date and with high resolution technological platform for genomic and biotechnology studies, related to efficient utilization of legume plants in a modern agrobiological is envisaged.

Such an objective determines the structure and content of the literature survey where in an analytical, comprehensive and competent way is analyzed the up to date knowledge of a core for a modern legume genomics and biotechnology questions like the choice of the suitable model, plant regeneration through somatic embryogenesis, somaclonal variation, genetic transformation mobile genetic elements, forward and reverse genetic approaches, as well as some genome, proteome and metabolome aspects of their functional genomics. The survey and thesis as a whole would benefit from some extension of the final paragraph dealing with the prospects for transfer of knowledge from model plants functional genomics to members of the family with agricultural importance.

Based on the major objective which I do accept as a thesis key goal there are 10 experimental tasks formulated, with the 10th one divided into the 6 sub tasks. Some of them might be more informative after fine tuning of their phrasing - for example in tasks 8 and 9 it is not clear which are the genes analyzed, as well as that of task 10, where „performance of analyses“ might be skipped. As a whole however I do accept the logic and continuity of the research tasks listed.

Materials and methods section is an important part of the thesis. On a more than 40 pages with details and competence the experimental procedures and protocols applied in the study are displayed according to the nature and order of their realization. In this respect a successful solution is the schematic presentation of the applied methodology included within the self-evaluation assay which displays very clear the intrinsic logic and relationship between individual experimental procedures. It is a pity that this scheme is not a component of the thesis per se. Information load, structure and illustrative power of this section makes it an up

to date and of high level practical guide on functional genomics and biotechnology of legumes.

The ample amount of the experimental data obtained determines and justifies combined presentation of the results and their discussion. As a structure and order of presentation this the most ample section of the study (about 150 pages) reflects significantly the logic of problems visualized and discussed in the literature survey, which also contributes to the soundness of the dissertation objective. It is worth to mention the clearly presented link between the project base of the performed investigations as well as their significance for the scientific portfolio of the Functional genomics group of AgroBioInstitute as a whole. This is relatively rare approach in the area where in general investigations are exclusively team effort, more over some of the thesis finding are result of successful collaboration with leading European Labs working in the field of genomics. It is worth mentioning also precise attitude to the terminology and its transliteration from English in the study. Due probably to nature of the data obtained some of the results describing the protocols for genetic transformation for example, are somewhat burdened with methodological data which could be easily transferred to materials and methods or into the supplements. In some discrepancy with the very high quality of the illustrations, the legends of figures 12, 13, 14 and 15, characterizing the mutant lines *M. truncatula* with Tnt1 inserts by IRCR analyses and transposon display are not informative enough.

Based on the experimental data obtained during the thesis preparation there are 16 conclusions formulated. Among them I would like to distinguish the development of effective systems for insertional mutagenesis based on the retrotransposon Tnt1 in *M. truncatula* and *Lotus japonicus*, a new retroelement MERE1-1 identified with proved transposition into genomes of the mutant lines *Medicago truncatula* and established genome size in diploid representatives of this species, construction of vectors with modulated expression and analyses of promotor activity of the genes *MtLAX3*, *MtARFB3*, *MtF-box*, *MtHAC*, *MtGRAS*, and *MtDRP* based on the incorporation of Tnt1 retrotransposon into the exons of these genes, homozygous transgenic plants obtained and characterized by overexpression and suppressed expression of the gene coding for the F-box protein (mediator of protein-protein interactions with important role in RNA-dependent gene silencing and plant development in *A. thaliana*), the activity of marker genes GUS and GFP and expression of the gene coding for the F-box protein localized in tissues and organs of transgenic plants of *M. truncatula* and *A. thaliana*, the activity of this gene established during the cell cycle progression in *M. truncatula* и *A. thaliana*, and at the end but not the last by application of Tandem Affinity Purification a

common interactor of the gene coding the F-box protein is identified and his expression profile in transgenic *M. truncatula* and *A. thaliana* plants with modulated expression is established. It is my feeling that phrasing of some of the conclusions is somehow too long and their number could be reduced without influence on the scope and coverage.

The applicant has formulated in her self-assessment report as a result of her investigations 7 fundamental contributions and 2 with applied nature. Among them it is worth to mention the priority character of studies on genome size of diploid representatives of genus *Medicago* with Algerian origin, where correlation between the genome size and potential for induction of direct somatic embryogenesis in liquid media is established. With innovative nature are also data for the existence or the retroelement *MERE1-1* into genomes of mutant lines *M. truncatula* which is transposed during regeneration *in vitro*, as well as the identification of the insertion mutant line with phenotypic characteristic "Fish bone". High value are also the complex investigations on gene coding the F-box protein, based on phenotypic, morphometric and genome, proteome and metabolome approaches. The establishment of collection of *Tnt1* insertion mutants in lines of *M. truncatula* cv. Jemalong by protocols for effective transposition as well as a small collection of *Tnt1* insertion mutant in *Lotus japonicus* also has to be admired, as well as also the involvement of *Tnt1* mutants created in AgroBioInstitute in the International database „Samuel Roberts Noble Foundation“. Contributions with applied value are exemplified by the creation of the experimental protocol for transformation of cellular suspension cultures in order to establish stable transgenic plants *M. truncatula* as well as by development of effective system for synchronization of meristematic cells from root tips in the context of investigations on the cell cycle progression of this species.

I have also some remarks out of the mentioned so far. In the abbreviations list both RNAi and amiRNA lines are designated as lines with suppressed expression which is generally correct but it would be more precise if amiRNA definition will include also "artificially transformed". In the list of publications related to the thesis the impact-factor of the papers is not stated although some of them like Plant Physiology (IF 5.949), Plant Cell Reports (IF 2.989) are with the sound rating. There is also some discrepancy between the number of scientific and applied contributions in the self-evaluation report and the respective document. As about the supplements the explanation in the beginning of each one is not very informative and the reference to the respective data is not easy. The thesis would definitely benefit also from some extension of the last section - discussion on summary of the data for the 3 model species as an important component of an effective approach into the post-genomic era. More thorough

discussion about the potential application of these data to other representatives of the Legume family with agricultural significance is advisable.

Conclusion

The thesis elaboration of Dr. Anelia Yantcheva is fully in agreement with the spirit and the rules of the National regulations (The Law for Development of the Scientific Staff) in Bulgaria, as well as with the criteria and regulations of the law and that of the Agricultural Academy for obtaining the academic degree “doctor of sciences”. The self-assessment report reflects properly the most important characteristics of the Thesis and I do accept its structure and content. I do agree also with the fundamental and applied contributions as formulated by the applicant. The obtained experimental data and their discussion indicate that the major thesis goal, namely to perform complex evaluation of the application of a set of model plant species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* in the frames of the modern functional genomics and biotechnology of Legume plants, is successfully achieved. The respected literature sources where the major part of the experimental data obtained in the course of thesis elaboration are published – international journals with sound impact rating as well as chapters of books issued by publishers like Springer and Noble Research Institute - are unequivocal proof that the results obtained are internationally acknowledged from the scientific society working in the field of plant genomics and biotechnology. All together the thesis of Dr. Anelia Yantcheva is one contemporary and innovative study with international dimensions and proved contributions for the theory and practice of research in the field of genomics, genetics, molecular biology and biotechnology of nitrogen fixation plants with proved potential for successful transfer of knowledge to other representatives of Legume family with agricultural significance. Based on these arguments I would strongly recommend the respected Academic board to award the academic degree “doctor of science” to Assoc. Prof. Anelia Veneva Yantcheva, PhD, in Scientific area 4 “Natural sciences, mathematics and informatics”, professional field 4.3 Biological sciences, scientific specialty “Genetics”, code 01.06.06.

30.09.2019.


/Prof. Lubomir Stoilov, PhD/