

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на научна степен "Доктор на науките" в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Генетика

Автор: доц. д-р Анелия Венева Янчева - ръководител на отдел Функционална Генетика, Агробиоинститут, ССА – София

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

Рецензент: доц. д-р Николай Кирилов Христов, Агробиоинститут, ССА – София, определен за член на научното жури със заповед № РД08-156 от 02.08.2019 г. от Председателя на ССА, гр. София,

### 1. Общо описание на представените материали

Със заповед на от Председателя на ССА съм определен за член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационен труд на тема: „Роля на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana* в изследванията по растителна биотехнология и функционална геномика на Бобови ”, за придобиване на научна степен „Доктор на науките” в професионално направление, 4.3 Биологически науки, научна специалност Генетика. На първото заседание на научното жури бях избран за рецензент на дисертацията с протокол №1/05.08.2019 г.

Представеният от доц. Анелия Янчева комплект материали в електронен вариант и на хартиен носител е в съответствие с Чл. 65 (1) от Правилника за прилагане закона за развитие на академичния състав в ССА и включва следните документи:

- дисертационен труд
- автореферат с включено предложение за приноси по дисертацията
- справка за съответствие с минималните национални изисквания и изискванията правилника на ССА за придобиване на научна степен в съответната научна област и професионално направление.
- протокол от първичното научно звено за предварително обсъждане на дисертационния труд
- копие от диплома за ОНС „доктор”
- творческа автобиография в европейски формат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на научните публикации
- справка за научните приноси от дисертацията;

### 2. Кратки биографични данни за кандидата

Доц. Анелия Янчева е родена през 1964 г. в гр. София. Завършва Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, откъдето през 1987 г.

получава магистърска степен по биология със специализация в областта на ботаниката. От 1989-1996 г. е редовен докторант по „Генетика“ в Институт по генетично инженерство-Костинброд, на тема: „Регенерация и Генетична Трансформация на български сортове мини карамфил“ и след успешна защита през 1997 год. получава образователната и научна степен „доктор“ по специалността. През 1997 год. е назначена на длъжност и. с. II ст. в Институт по генетично инженерство-Костинброд (сега Агробиоинститут-София) където работи и досега. В този институт тя преминава последователно през длъжностите научен сътрудник II ст. (1997-1998), научен сътрудник I ст./гл. асистент (1999 – 2005), а през 2006 е избрана за старши научен сътрудник II ст. (доцент). От 2006 год. до 2018 год. доц. Янчева е доцент в група “Функционална генетика-бобови”, Агробиоинститут на която група през 2011 год. става ръководител. През 2019 год. след реорганизация на структурата на Агробиоинститут при която групите по Функционална генетика-бобови и Функционална генетика-житни се обединяват в отдел Функционална генетика, доц. Янчева е избрана за ръководител на този отдел.

Доц. Анелия Янчева е била член на комисията за подбор на докторанти и пост-докторанти за едномесечни обучения във високотехнологични комплекси по проект на МОН “Наука и бизнес” (2011-2014 г.) и член на ИС на ФНИ (2014-2017 г.). Настоящ член е на съюза на учените в България (СУБ) и Европейската организация по растителни науки (EPSO). В хода на академичното си развитие, доц. Янчева е осъществила голям брой краткосрочни и средносрочни специализации във водещи центрове в областта на растителната физиология, генетика и геномика, като Института по Растителна и Системна Биология, Гент Белгия, Института по Растителни Науки Жив сюр Ивет, Франция, Изследователския център на ICGEB в Ню-Делхи-Индия, със стипендии от авторитетни международни организации. Участвала е в разработването на голям брой национални и международни проекти, включително в един международен проект в рамките на РП 5 на ЕС и два в рамките на РП 6 на ЕС. Ръководила е множество национални и международни научно-изследователски проекти, включително два текущи Европейски проекта по програма Хоризонт2020 и по дейности МСК. В резултат от активното ѝ участие в третата степен на обучение на студентите, под нейно ръководство има защитени три дисертации за ОНС “доктор”.

### **3. Актуалност на тематиката**

Геномиката е бързо развиващо се в направление в биологичните науки което дава възможност да се дешифрират механизмите на биологичните процеси въз основа на информацията получена от пълното секвениране на геномите на тези организми. Функционалната генетика/геномика цели разгадаване на функциите на всеки отделен ген чрез интегриран подход, базиран на идентифициране на мутанти в набелязания ген чрез методите на права или обратна генетика и характеризирание на неговото фенотипно проявление на различни нива на организация (ДНК, РНК, полипептиди, метаболити, визуални фенотипни промени) чрез използване на голям набор от разнообразни биохимични и физиологични методи. От съществено значение за развитието на функционалната генетика/геномика е наличието на детайлна информация за секвенцията на генома на съответния вид. Геномиката на бобови

растения е ново научно направление, с два моделни обекта - *Medicago truncatula* и *Lotus japonicas* които през последните 10 години се утвърдиха като модели за молекулярни, генетични и биохимични изследвания поради сравнително малкия геном и податливост към *in vitro* култивиране. За развитието на функционалната генетика при тези два обекта от изключителна важност е създаването на колекции от голям брой мутантни форми. Важно предимство на мутантните форми, създадени чрез трансформация с *Agrobacterium* или транспозонен мутагенез в сравнение тези получени чрез прилагане на традиционните химични или физични методи е, че позволяват бърза и лесна идентификация на мутиралия ген чрез секвенцията на Т-ДНК или транспозона интегрирани в него. По тази причина *Agrobacterium* и транспозонните мутанти са предпочитани и широко използвани във функционалния анализ на гени, както с подходите на правата, така и на обратната генетика. В световен мащаб такива колекции вече са създадени и при моделните бобови растения, но натрупаните колекции са много по-малки от тези при *Arabidopsis*. Обогащаването на колекциите от мутанти при *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* е от особено значение за изучаване действието на гените свързани със симбионтната азотфиксация, тъй като такава липсва при *Arabidopsis* и другите моделни растения. От съществено значение за повишаване ефективността на генериране на инсерционни мутанти, а оттам и по-бързо обогащаване на съществуващите колекции, е оптимизацията и усъвършенстването на методите за *in vitro* култивиране и генетична трансформация на моделните бобови култури. Представеният ми за рецензиране дисертационен труд разработва именно тези, все още нерешени проблеми и демонстрира ефективността на функционалната генетика при моделни бобови растения чрез задълбочен и детайлен анализ на функцията на ген кодиращ F-бокс протеин от *Medicago truncatula*. Гореизложеното дава убедително основание подбраната тематика да бъде определена като изключително актуална в световен мащаб.

#### **4. Структура, цели и методичен подход на дисертационния труд**

Дисертацията на доц. Анелия Янчева е написана на 270 страници, като е структурирана съгласно възприетите стандарти за този вид научен труд. Тя включва основните раздели: Увод от 3 стр., Литературен преглед - 41 стр., Цел и задачи на дисертационния труд - 2 стр., Материали и методи - 42 стр., Резултати и обсъждане - 138 стр., Заключение - 2 стр., Изводи - 2 стр. и приноси представени на 1 стр. Дисертационният труд е онагледен с 71 фигури и 23 таблици, както и 2 приложения от общо 43 стр. включващи 26 допълнителни фигури и 3 допълнителни таблици.

Литературният преглед е доста обширен, но балансиран като съдържание за да обхване всички аспекти по темата на дисертацията, и показва отлично познаване на публикуваната информация. Използвани са общо 501 литературни източника, всички на латиница. Поради големия обем информация в различни области от биологията, пряко свързани с темата на дисертационния труд, литературният преглед е логично разпределен в 6 раздела фокусирани върху: 1) значението на моделните растения; 2) соматичен ембриогенез; 3) генетична трансформация; 4) инсерционен мутагенез; 5) какво е права и обратна генетика и 6) предмета и значението на функционалната геномика. В първия раздел е направен преглед на значението на моделните бобови растения *Medicago*

*truncatula* и *Lotus japonicus* за изучаване механизмите на грудкообразуване и симбионтна азотфиксация. Разделът обхващащ соматичния ембриогенез е най-задълбочено разработен и заема най-голям дял от литературния преглед, което е логично предвид широкото приложение на соматичния ембриогенез и огромния научен интерес за дешифриране механизмите на този процес. Подробно са разгледани ролята на асиметричното делене за отключване процеса на соматичен ембриогенез, както и влиянието на синтетичния ауксин 2-4Д и други фитохормони и физични и химични фактори върху процеса на формиране развитие и зреене на соматичното ембрио. Следващия раздел е посветен на методите за генетична трансформация при моделните бобови растения като е акцентирано върху най-често използваните методи използващи *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* като вектори за пренос на рекомбинантната ДНК в генома на растението. Отбелязано е значението на трансформацията с *A. rhizogenes* за изучаване на процеса на нодулация и симбионтна азотфиксация. *A. rhizogenes* предизвиква появяване на несъщински корени които могат да бъдат заразени с бактерии от рода *Rizobium* и да образуват симбионтни грудки. В раздел IV, посветен на инерционния мутагенез, са обхванати изследванията свързани с двата *Coria-like* ретротранспозони *Tnt-1* и *LORE-1*, които са най-често използвани за генериране на инсерционни мутанти съответно при *M. truncatula* и *L. japonicus*. Голямото количество информация е добре систематизирано и обобщено. Представянето на разглежданите данни е ясно и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания.

За да отрази мултидисциплинарния подход на изследването, целта на дисертационният труд е формулирана по-общо като: „утвърждаване 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“. Тази всеобхватно формулирана цел е конкретизирана и прецизирана в десет комплексни задачи, последната от които разделена на 6 подзадачи, които ясно очертават периметъра на проведените изследвания. За решаването на поставените задачи е използван богат набор от удачно подбрани съвременни експериментални техники. В разделът „Материали и методи“, на 42 стр. подробно са описани използваните биологични материали (растителен материал, бактериални щамове, плазмидни вектори, аналитични китове и др.), както и на усвоения и използван в изследването впечатляващ набор от експериментални методи представляващи съществен дял от арсенала на функционалната генетика. Групирането на материалите и методите в седем раздела, до голяма степен съответстващи на задачите за изпълнението на които са използвани, е добро решение улесняващо читателя да се ориентира в богатия набор от използвани методи. Представянето на експерименталните процедури съдържа достатъчно информация, необходима за оценка на проведените експерименти и позволява възпроизвеждане на експериментите без необходимост от допълнителна методична литература. Тук бих си позволил една колегиална препоръка разделът “Материали и методи” да се оформи като практическо ръководство по функционална геномика на моделните бобови растения да се издаде. Такова ръководство доколкото ми е известно няма издадено на български език и ще бъде изключително полезно за

студенти, специализиращи генетика, молекулярна биология, биотехнологии и сродни специалности, както и за начинаещи докторанти в тези направления.

## **5. Анализ и оценка на резултатите**

Най-съществена част от дисертационния труд е разделът „Резултати и обсъждане”, изложен на 138 страници и богато илюстриран с 71 фигури и 23 таблици. Трудно мога да обхвамя всичко поради големия обем оригинални експериментални резултати представен в раздела. По-скоро ще се опитам да акцентирам върху някои от резултатите представляващи **съществен принос за фундаменталната наука.**

Наблюденията с конфокален микроскоп върху клетъчна суспензия индуцирана от трансгенни растения *M. truncatula*, експресиращи маркерния ген *GFP* показват, че клетъчната фракция е композирана от три типа клетки – сферични, елипсовидни и издължени. Открита е **асиметрия на първото клетъчно делене при моделните системи *M. falcata* и *M. truncatula* в течна хранителна среда.** Показано е важното значение на моделните обекти бобови *M. falcata* и *M. truncatula* за изучаване на ранни събития като – първо клетъчно делене, индуциране на ембриогенен потенциал при соматични ембриони от единични клетки. Тези системи са перфектен инструмент за проследяване на процеса на растително развитие от една клетка до цяло растение и вникване в същността на някои механизми.

На основата на продължителни експерименти с представители на род *Medicago* са емпирично **установени оптимални параметри за ефективно генериране на стабилни трансгенни растения.** Успешно се използват растителни експлантати от листа и листни дръжки от *in vitro* растителен материал на възраст 30-35 дни.

Значително научно постижение е **създаването на колекция от *Tnt1* инсерционни мутанти при *M. truncatula*.** Като първа стъпка са разработени два нови протокола за **индиректен соматичен ембриогенез**, които значително повишават транспозиционната активност. Направена е подробна фенотипна характеристика на получените инсерционни мутанти при *in vitro* и оражерийни условия. В хода на това изследване е **открит инсерционен мутант с нов, неописан досега, коренов фенотип наречен от откривателите „рибена кост”.**

Много важни са изследванията насочени към разработване на **система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно бобово растение *L. japonicus*.** Наличието на алтернатива, различна от ендоретротранспозона *LORE1*, за създаване на мутантни линии при това моделно растение може да доведе до по-ефективно генериране на нови инсерционни мутанти в *L. japonicus*.

Изключително постижение на авторката, в сътрудничество с френски учени, е **идентифицирането на ендоретротранспозона *MEPE-1-1* в *M. truncatula* и доказването, че той се транспозира при регенерация в тъкани култури.** Това откритие е от фундаментално значение както за правата, така и обратната генетика. Следствие от това откритие е, че секвенирането на фланкиращите последователности на *MEPE-1-1* в съществуващите колекции

инсционни мутанти ще открие inserции на *MERE-1-1* в нови гени в допълнение на тези вече идентифицирани с *Tnt1* или T-DNA.

Значително научно постижение е **детайлното изследване на функцията на гена кодиращ F-box протеин** от генома на моделното бобово растение *M. truncatula* и неговия потенциален ортолог в моделното растение *A. thaliana*. То е добър пример за дългия път който трябва да се измине за установяване на истинската функция на лален ген и как трудностите се преодоляват, чрез алтернативни подходи във функционалната генетика. Включването на *A. thaliana* като допълнително моделно растение не само допълва и подкрепя резултатите получени от експериментите при моделното бобово растение, но **позволява да се докаже еволюционно консервативна функция на този протеин между бобови и кръстоцветни.**

Резултатите са изложени точно и ясно, без грешки и разминавания между текста и съдържащите се във фигурите и таблиците данни. Забележително е качеството на илюстративния материал, особено на микроскопските снимки. Където е необходимо е извършена статистическа обработка с подходящи методи. Обсъждането на резултатите е задълбочено и логично води до формулиране на изводи, адекватни на получените резултати, които приемам без възражения.

## **6. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

### *6.1 Приноси с фундаментална научна стойност*

6.1.1. В течна хранителна среда за първи път на моделни клетъчни суспендиални култури от *M. truncatula* и *M. falcata* е **доказана асиметрията на първото клетъчно делене**, индуцирането на ембриогенен потенциал и развитието на процеса на ДСЕ от единична клетка до цяло растение.

6.1.2. За първи път в генома на мутантни линии от *M. truncatula*, е **открит нов ретроелемент *MERE1-1*** и е **доказано, че транспозицията му се активира по време на *in vitro* регенерация.**

6.1.3. За първи път в сравнително функционално-генетично изследване включващо фенотипни, морфометрични, транскриптомни, протеомни и метаболомни анализи е **установена функцията на ген кодиращ F-box белтък в моделното бобово растение *M. truncatula* и неговия ортолог в *A. thaliana*.**

6.1.4. Създадена е **колекция от *Tnt1* инсционни мутантни линии при *M. truncatula* cv. Jemalong** чрез протоколи за ефективна транспозиция. Направена е подробна фенотипна характеристика на получените инсционни мутанти при *in vitro* и оранжерийни условия.

6.1.5. След подробна фенотипна характеристика е **открит инсционен мутант с нов, неописан досега, коренов фенотип наречен от откривателите „рибена кост“**. Фланкиращите ДНК последователности на *Tnt1* и *MERE1-1* инсъртите са секвенирани.

6.1.6. Разработена е малка колекция от *Tnt1* инсционни мутантни линии при второто моделно растение на сем. бобови - *Lotus japonicus*.

6.1.7. За първи път е изследван размера на генома на диплоидни видове от род *Medicago* с произход от Алжир и е установена връзката между размера на генома и компетентността за индуциране на ДСЕ в течна среда.

#### 6.2 Методични приноси с научно-приложна стойност

6.2.1. Създаден е ефективен протокол за генетична трансформация на клетъчни суспендиални култури от *M. truncatula*, при който се регенерират стабилни трансгенни растения от единични клетки и създават възможност за анализи на клетъчно и субклетъчно ниво.

6.2.2. Разработена е система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета подпомагаща изследвания на клетъчния цикъл при моделното растение *M. truncatula*

6.2.3. На базата на създадения ефективен протокол за генетична трансформация е разработена система за *Tnt1* инсерционен мутагенез при второто моделно бобово растение *L. japonicus*.

#### 7. Преценка на публикациите свързани с дисертационния труд и други наукометрични показатели и съответствието им с изискванията на ЗРАСРБ и правилника за приложението му

Във връзка с дисертационния труд е представен списък на 11 публикувани от доц. Янчева научни статии, всички в списания с импакт фактор или импакт ранг, и 2 глави от индексирани във Web of Science (WoS) книги. Всички представени статии са по тематиката на дисертационния труд. В 11 от представените публикации доц. Янчева е първи или кореспондиращ автор, в една е втори и в една шести по ред автор, което подчертава водещата роля на кандидатката в представените публикации. Две от представените статии са публикувани в списания от първия квартал на WoS (Q1), една в Q2, шест в Q3, една в Q4 и две от публикациите са в списания индексирани само в Scopus, което сумарно повече от два пъти надхвърля минималните изисквания на ЗРАСРБ и правилника за приложението му за професионално направление 4.3 Биологически науки. Представен е и списък с 51 цитирания в списания индексирани във WoS на статиите от представения списък, което също надхвърля минималните законови изисквания.

#### 8. Автореферат

Представеният автореферат е събран на 56 страници, оформен е според изискванията и отразява в резюмиран вид основните резултати, изводи и приноси представени в дисертационния труд.

#### 9. Критични бележки и въпроси

В дисертационния труд, автореферата и в публикациите не съм забелязал груби, компрометиращи крайните резултати методични и други грешки. Забелязаните неизбежни дребни технически пропуски не променят цялостното отлично впечатление от проведените изследвания и тяхното представяне.

- Забелязано е известно разминаване при номерацията и форматирането на подзаглавията, например между Литературния преглед и Материали и методи и между отделните подраздели в Материали и методи в дисертацията

- На предоставеният ми електронен вариант на Автореферата липсва номерация на страниците. Надявам се този технически пропуск да е избегнат при отпечатването.
- **Въпроси:** В дисертацията са представени резултати доказващи транспозицията на *MERE-1-1* само в колекции инсерционни мутанти на *M. truncatula*, които са трансгенни с T-DNA или *Tnt1*. 1) Има ли данни за автономна транспозиция на *MERE-1-1* при тъканно култивиране на див тип, нетрансгенни *M. truncatula* и ако не, планират ли се изследвания в тази насока за създаване на алтернативна платформа, подобна на *LORE1* при *L. japonicus*? 2) В тази връзка, има ли данни за транспозиция на *LORE1* в създадената мини колекция от *Tnt1* инсерционни мутанти в *L. japonicus*?

#### 10. Лични впечатления

Познавам доц. Анелия Янчева вече повече от четвърт век. Любопитството, трудолюбието, целеустремеността, дисциплината и мотивацията, която тя притежаваше в младежките години, в този труд се е трансформирала в научна компетентност и изследователска зрялост. Доц. Янчева винаги е проявявала колегиално отношение и се е отзовавала да помогне на колеги с професионален съвет или консуматив. С натрупания опит, притежава и прилага добри лабораторни и организаторски практики, способност да работи в екип, да го оглавява и мотивира.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представения ми за рецензиране дисертационен труд в съвкупност представлява фундаментален труд по функционална генетика и геномика в който са направени значителни научни приноси в усвояването на трите моделни обекти, *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*, като инструменти на функционалната генетика в геномиката. Отличната информираност, правилното методично залагане и прецизно провеждане на експерименталната работа, както и интерпретирането и анализирането на получените резултати е позволило на авторката да регистрира значими научни приноси с теоретичен, методичен и приложен характер. След обстойно запознаване с дисертационния труд и представените резултати убедено давам своята **ПОЛОЖИТЕЛНА** оценка и считам, че авторката отговаря изискванията за научната степен "Доктор на науките". На основата на гореизложеното, предлагам на Уважаемите членове на научното жури да присъдят на доц. Анелия Янчева научната степен „Доктор на науките“ в професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Генетика.

03.10.2019 г.

Подпис:

доц. д-р Николай Христов



## REVIEW

Of a dissertation for fulfillment of the degree of **Doctor of Science** in the  
Professional field: 4.3. Biological sciences, Specialty: Genetics

Author: **Assoc. Prof. Anelia Veneva Yancheva** - Head of Functional Genetics Department,  
Agrobiointitute, Agricultural Academy - Sofia

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

Reviewer: **Assoc. Prof. Nikolai Kirilov Christov**, Agrobiointitute, Agricultural Academy -  
Sofia, appointed as a member of the scientific jury by order No. RD08-156 of 02.08.2019 of  
the President of Agricultural Academy, Sofia,

### 1. General description of the materials presented

By an order of the President of the Agricultural Academy I was appointed a member of the scientific jury to conduct a procedure for defense of a dissertation work on the topic: "**The role of model species *Medicago truncatula* , *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* in plant biotechnology and functional genomics studies of legumes**", for the degree of "Doctor of Science" in the Professional field: 4.3 Biological Sciences , Specialty: Genetics. At the first meeting of the scientific jury I was selected as one of the reviewers of the dissertation with protocol №1 / 05.08.2019.

The set of materials in electronic and in paper form presented by Assoc. Prof. Anelia Yancheva is in accordance with **Art. 65** (1) of the Rules for Implementation of the Law for the Development of Academic Staff in the Agricultural Academy and includes the following documents:

- dissertation work
- abstract including a proposal for scientific contributions of the dissertation
- reference for compliance with the minimum national requirements and the requirements of the Agricultural Academy Regulations for the acquisition of a scientific degree in the relevant scientific field and professional field.
- Minutes from the primary scientific unit for preliminary discussion of the dissertation
- a copy of the diploma for the Doctor's (PhD) degree
- CV in European format
- list of scientific publications on the topic of the dissertation
- copies of scientific publications

### 2. Brief CVs of the applicant

Assoc. Prof. Anelia Yancheva was born in 1964 in Sofia. She graduated from the Faculty of Biology at Sofia University "St. Kliment Ohridski ", where she received her master's degree in biology with a specialization in botany in 1987. From 1989-1996 she was a

full-time doctoral student in Genetics at the Institute of Genetic Engineering-Kostinbrod, on the theme: "Regeneration and Genetic Transformation of Bulgarian varieties of mini carnations" and after successful defense in 1997 she received the educational and scientific degree "Doctor" (PhD). In 1997, she was appointed to the position of research associate II-nd degree at the Institute of Genetic Engineering-Kostinbrod (now Agrobiointitute-Sofia), where she has worked so far. At this institute, she consistently goes through the positions of research associate II-nd degree (1997-1998), research associate I-st degree /Chief Assistant Professor (1999-2005), and in 2006 she was selected as a Senior Research Associate (Associate Professor). From 2006 to 2018, Dr. Yancheva was an Associate Professor in the group "Functional Genetics-legumes", at the Agrobiointitute of which group in 2011 she became a leader. In 2019, after structural reorganization of the Agrobiointitute, the groups of Functional Genetics-Legumes and Functional Genetics-Cereals united into Functional Genetics Department and Assoc. Prof. Yancheva was selected as head of this department.

Assoc. Prof. Anelia Yancheva was a member of the committee for selection of doctoral students and post-doctoral students for one-month trainings in high-tech complexes under the project of the Ministry of Science and Education (2011-2014) and a member of the Executive Comity of the National Science Found (2014-2017). She is a current member of the Union of Scientists in Bulgaria (USB) and the European Plant Science Organization (EPSO). During her academic career, Assoc. Prof. Yancheva has completed a large number of short and medium term specializations in leading centers in plant physiology, genetics and genomics, such as the Institute of Plant and System Biology, Ghent Belgium, the Institute of Plant Sciences Gif sur Yvette, France, ICGEB Research Center in New Delhi-India, etc. with scholarships from reputable international organizations. She has participated in the development of a large number of national and international projects, including one international project under FP5 of the EU and two under the EU-FP6. She has managed a number of national and international research projects, including two ongoing European projects under the Horizon2020 program and under MSC activities. As a result of her active participation in the third stage of student education, three dissertations for PhD have been defended under her supervision.

### **3. Relevance of the topic**

Genomics is a rapidly growing direction in the biological sciences that makes possible deciphering the mechanisms of biological processes based on information obtained from complete genome sequence. Functional genetics/genomics aims to unravel the functions of each individual gene by an integrated approach based on the identification of mutants in the target gene by forward or reverse genetics approaches and characterization of its phenotypic manifestation at different organization levels (DNA, RNA, polypeptides, metabolites, visual phenotype changes) using a wide variety of biochemical and physiological methods. Essential for the development of functional genetics/genomics is the availability of detailed information on the genome sequence of the species of interest. Genomics of leguminous plants is a new scientific area, with two model plants - *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, which over the past 10 years have established themselves as models for molecular, genetic and biochemical studies due to their relatively small genome and amenability to *in vitro* cultivation. For the development of functional genetics in these two species it is of utmost importance to create collections of a large number of mutant forms. An important advantage

of mutant forms created by transformation with *Agrobacterium* or transposon mutagenesis over those obtained by applying conventional chemical or physical methods is that they allow rapid and easy identification of the mutated gene by the T-DNA sequence or the transposon integrated therein. Therefore *Agrobacterium* and transposon mutants are preferred and widely used in functional analysis of genes by both forward reverse genetics approaches. Globally, such collections have already been created in model legumes, but the accumulated collections are much smaller than those in *Arabidopsis*. Enrichment of mutant collections in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* is of particular importance for investigating the effects of symbiotic nitrogen fixation genes, as such are not present in *Arabidopsis* and other model plants. Essential for increasing the efficiency of insertion mutant generation and, consequently, the faster enrichment of existing collections, is the optimization and refinement of methods for *in vitro* cultivation and genetic transformation of model legumes. The dissertation presented for my review elaborates those still unresolved problems and demonstrates the effectiveness of functional genetics in model legumes by thorough and detailed analysis of the function of a gene encoding an F-box protein of *Medicago truncatula* and its putative ortholog in *Arabidopsis thaliana*. The aforementioned provides a compelling reason to consider the selected topic extremely relevant globally.

#### **4. Structure, goals and methodological approach of the dissertation**

Assoc. Prof. Anelia Yancheva's dissertation is written on 270 pages, structured according to the accepted standards for this type of scientific work. It includes the following main sections: Introduction of 3 pages, Literature review - 41 pages, Goals and tasks of the dissertation - 2 pages, Materials and methods - 42 pages, Results and discussion - 138 pages, Conclusion - 2 pages and contributions presented on 1 page. The dissertation is illustrated with 71 figures and 23 tables, as well as 2 appendices comprising in total of 43 pages, including 26 additional figures and 3 additional tables.

The literature review is quite extensive but balanced in content to cover all aspects of the dissertation and shows excellent knowledge of the published information. A total of 501 literary sources were used. Due to the large amount of information in various fields of biology, directly related to the topic of the dissertation, the literature review is logically divided into 6 sections focused on: 1) the importance of model plants; 2) somatic embryogenesis; 3) genetic transformation; 4) insertional mutagenesis; 5) what is forward and reverse genetics and 6) the subject and importance of the functional genomics. The first section reviews the importance of model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* in studying the mechanisms of nodulation and symbiotic nitrogen fixation. The section covering somatic embryogenesis is the most thoroughly elaborated and occupies the largest share of the literature review, which is logical given the widespread use of somatic embryogenesis and the huge scientific interest in deciphering the mechanisms of this process. The role of asymmetric division for unlocking the process of somatic embryogenesis, as well as the influence of synthetic auxin 2-4D and other phytohormones and physical and chemical factors on the process of formation and maturation of the somatic embryo are discussed in detail. The following section is devoted to methods of genetic transformation in model legumes, focusing on the most commonly used methods using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* as vectors for recombinant DNA transfer into the plant genome. The importance of transformation with *A. rhizogenes* for studying the process of nodulation and symbiotic nitrogen fixation is distinguished. *A. rhizogenes* causes the emergence of hairy roots that can be infected with bacteria of the genus *Rizobium* and form symbiotic nodules. Section IV on insertional mutagenesis covers studies related to two Copia-like retrotransposons *Tnt-1* and *LORE-1* that are most commonly used to generate insertion mutants in *M. truncatula* and *L. japonicus*, respectively. The large amount of information is

well organized and summarized. The presentation of the data under consideration is clear and includes all the basic assumptions needed to justify and understand the studies carried out.

In order to reflect the multidisciplinary approach of the research, the purpose of the dissertation is formulated more generally as: "Affirming the role of the model legumes *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and the model plant *Arabidopsis thaliana* in present-day research on plant biotechnology, comparative and functional genomics, and their significance for understanding the plant biology of legumes." This broadly formulated objective is further specified and refined into ten complex tasks, the last of which is divided into 6 sub-tasks that clearly delineate the perimeter of the research. A wide range of well-selected contemporary experimental techniques were used to complete these tasks. The Materials and Methods section, on 42 pages describes in detail the biological materials used (plant material, bacterial strains, plasmid vectors, analytical kits, etc.), as well as impressive and assorted set of experimental methods that are used in the study and represent a large share of the arsenal of functional genetics. The grouping of materials and methods into seven sections, largely relevant to the tasks for which they were used, is a good solution, making it easier for the reader to navigate the wide range of methods used. The presentation of the experimental procedures contains sufficient information needed to evaluate the experiments performed and allows the experiments to be repeated by others without the need for additional methodological literature. Here, I would allow a collegiate recommendation to redesign and publish the Materials and Methods section into a practical guide to functional genomics of model legumes. Such a guide, to my knowledge, has not been published in Bulgarian language and will be extremely useful for students specializing in genetics, molecular biology, biotechnology and related subjects, as well as for beginning PhD students in these fields.

## 5. Analysis and evaluation of results

The most important part of the dissertation is the Results and Discussion section, set out on 138 pages and richly illustrated with 71 figures and 23 tables. I can hardly cover everything because of the large volume of original experimental results presented in the section. Rather, I will try to focus on some of the results that make a **significant contribution to fundamental science**.

Observations by a confocal microscope on cell suspension induced in transgenic *M. truncatula* plants, expressing the *GFP* marker gene, indicate that the cell fraction is composed of three cell types - spherical, elliptical and elongated. Discovered is an **asymmetry of the first cell division in the model systems *M. falcata* and *M. truncatula* in liquid medium**. The importance of the model objects of legumes *M. falcata* and *M. truncatula* for the study of early events such as the first cell division and induction of embryogenic potential in single cell has been demonstrated. These systems are the perfect tool to track the process of plant development from single cell to the whole plant and to understand the essence of some mechanisms.

Based on long-term experiments with representatives of the *Medicago* genus, **optimal parameters have been empirically established to efficiently generate stable transgenic plants**. Leaves and leaf stalks explants of *in vitro* cultivated plant material aged 30-35 days were successfully used as starting material.

A significant scientific achievement is the **creation of a collection of *Tnt1* insertional mutants in *M. truncatula***. As a first step, **two new protocols for indirect somatic**

**embryogenesis** have been developed that **significantly increase the transposition activity**. A detailed phenotypic characterization of the obtained insertion mutants was done under *in vitro* and greenhouse conditions. In the course of this study, an **insertion mutant was discovered with a new, previously undescribed, root phenotype and was named by inventors "fish bone"**.

Very important are studies aimed at developing a **system for *Tnt1* insertion mutagenesis in the second model legume *L. japonicus***. The availability of an alternative system, other than the endorethrotransposon *LORE1*, to create mutant lines in this model plant may result in more efficient generation of new insertion mutants in *L. japonicus*.

A remarkable achievement of the author, in collaboration with French scientists, was the **identification of the endorethrotransposon *MERE-1-1* in *M. truncatula* and proving that it is transposed upon regeneration in tissue cultures**. This finding is fundamental to both forward and reverse genetics. A consequence of this finding is that sequencing the *MERE-1-1* flanking sequences in existing insertion mutant collections will detect *MERE-1-1* insertions into new genes in addition to those already identified with *Tnt1* or T-DNA.

A significant scientific achievement is the **detailed study of the function of the gene encoding an F-box protein** from the genome of the model legume *M. truncatula* and its potential ortholog in the model plant *A. thaliana*. It is a good example of the long path that has to be taken to establish the true function of a gene and how alternative approaches can help overcome difficulties in functional genetics. The inclusion of *A. thaliana* as an additional model plant not only complements and supports the results obtained from the experiments on the model legume, but also **allows the evolutionary conservative function of this protein between legumes and cruciforms to be demonstrated**.

The results are presented accurately and clearly, with no errors or discrepancies between the text and the data contained in the figures and tables. The quality of the illustrative material, especially the microscopic images, is remarkable. Statistical analysis with appropriate methods has been carried out where necessary. Discussion of the results is in-depth and logical, and leads to the formulation of conclusions adequate to the obtained results, which I accept without objection.

## **6. Contributions and their importance to science and practice**

### *6.1 Contributions of fundamental scientific value*

6.1.1. **Asymmetry of the first cell division**, the induction of embryogenic potential and the development of the single cell-to-whole plant DSE process **have been demonstrated for the first time** in liquid culture media of model cell suspension cultures of *M. truncatula* and *M. falcata*.

6.1.2. For the first time in the genome of *M. truncatula* mutant lineages, **a new retroelement *MERE1-1* has been discovered and its transposition has been shown to be activated during *in vitro* regeneration**.

6.1.3. For the first time in a comparative functional genetic study involving phenotypic, morphometric, transcriptomic, proteomic and metabolic analyzes, the **function of an F-box protein coding gene in the model legume *M. truncatula* and its ortholog in *A. thaliana* was revealed**.

6.1.4. **A collection of *Tnt1* insertion mutant lines was created in *M. truncatula* cv.**

**Jemalong** through efficient transposition protocols. A detailed phenotypic characterization of the obtained insertion mutants was done under *in vitro* and greenhouse conditions.

6.1.5. Following a detailed phenotypic characterization, an **insertion mutant was discovered with a new, previously undescribed, root phenotype and was named by the inventors "fish-bone"**. The flanking DNA sequences of the *Tnt1* and *MERE1-1* inserts in this mutant were sequenced.

6.1.6. A small **collection of *Tnt1* insertion mutant lines was developed for the second model plant of the legume - *Lotus japonicus*** .

6.1.7. The **genome size of diploid species from the genus *Medicago* of Algerian origin was studied for the first time** and relationship between genome size and the competence to induce direct somatic embryogenesis *in vitro* was noted.

## 6.2 Methodological contributions of scientific and applied value

6.2.1 An **effective protocol for genetic transformation of cell suspensions of *M. truncatula*** has been created that allows regeneration of stable transgenic plants from single cells and enables cellular and subcellular analyzes.

6.2.2. A **system for synchronization of meristem cells from root tips of *M. truncatula* was developed** to support cell cycle studies in this model plant.

6.2.3. On the basis of the created effective protocol for genetic transformation, a **system for *Tnt1* insertion mutagenesis was developed for the second model legume *L. japonicus*** .

## 7. Assessment of the publications related to the dissertation work, other scientometric indicators and their compliance with the requirements of the Law for the Development of Academic Staff in Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation

In connection with the dissertation is presented a list of 11 scientific papers published by Assoc. Prof. Yancheva, all in journals with impact factor or impact rank, and 2 chapters of books indexed in Web of Science (WoS). All presented papers are on the topic of the dissertation. In 11 of the publications, Assoc. Prof. Yancheva is the first or correspondent author, in one is the second and in one is sixth in a row, which emphasizes the leading role of the candidate in the submitted publications. Two of the articles were published in journals from the first quartile of WoS (Q1), one in Q2, six in Q3, one in Q4 and two of the publications were indexed only in Scopus, which in total more than twice exceeds the minimum requirements of the Law for the Development of Academic Staff in Republic of Bulgaria and the Regulations for its application for the professional field 4.3 Biological Sciences. A list of 51 citations in WoS-indexed journals of articles in the presented list was also provided, which also exceeded the minimum legal requirements.

## 8. Abstract

The abstract, summarized in 56 pages, is designed according to the requirements and reflects in summary the main results, conclusions and contributions presented in the dissertation.

## 9. Critical notes and questions

In the dissertation, abstract, and publications I have not noticed major methodical and

other errors that could compromise the final results. The perceived inevitable small technical gaps do not change the overall excellent impression of the studies and their presentation.

- There is some discrepancy in the numbering and formatting of subheadings, for example, between Literature Review and Materials and Methods, and between the different sections in Materials and Methods in the dissertation.
- The page numbering in the provided electronic version of the Abstract is absent. I hope this technical glitch is avoided when printing.

**Questions:** The dissertation presents results demonstrating the transposition of *MERE-1-1* only in collections of insertion mutants of *M. truncatula* that are transgenic with T-DNA or *Tnt1*. **1)** Is there evidence of autonomous transposition of *MERE-1-1* in tissue cultivation of wild-type, non-transgenic *M. truncatula*, and if not, is there research planned to create an alternative platform for *M. truncatula* similar to that with *LORE1* in *L. japonicus*? **2)** In this regard, is there data on the transposition of *LORE1* into the created mini collection of *Tnt1* insertion mutants in *L. japonicus*?

### 10. Personal impressions

I have known Assoc. Anelia Yancheva for over a quarter of a century. The curiosity, industriousness, determination, discipline and motivation she possessed in her youth transformed in this dissertation work into scientific competence and research maturity. Assoc. Prof. Yancheva has always been collegial and has responded to help colleagues with professional advice or consumables. With the accumulated experience, she possesses and applies good laboratory and organizational practices, ability to work in a team, to lead and motivate.

### CONCLUSION:

The dissertation presented to me for review is a fundamental work on functional genetics and genomics, in which significant scientific contributions have been made to the development of the three model plants, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*, as tools for functional genetics in genomics. The excellent knowledge, correct methodological selection and precise implementation of the experimental work, as well as the interpretation and analysis of the obtained results allowed the author to register significant scientific contributions with theoretical, methodical and applied character. After a thorough acquaintance with the dissertation and the results presented, I am convinced of my **POSITIVE** assessment and believe that the author meets the requirements for the degree of "Doctor of Science". Based on the above, I propose to the Honorable Members of the Scientific Jury to award Assoc. Prof. Anelia Yancheva the "Doctor of Sciences" Degree in Professional field 4.3 Biological Sciences, Specialty Genetics.

03/10/2019

Signature:



Assoc. Prof. Dr. Nikolai Christov