

СЕЛСКОСТОПАНИСКА АКАДЕМИЯ  
СОФИЯ  
Вр. №. Н-91-25  
8.10 2019

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф., доктор Елена Иванова Георгиева

на дисертационния труд на **Анелия Венева Янчева** „*Роля на моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana* в изследванията по растителна биотехнология и функционална геномика на Бобови*“ представен за присъждане на научната степен „**Доктор на науките**“, в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма „**Генетика**“

### 1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-05-158/02.08.2019 г. на Председателя на ССА съм назначена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационния труд на **Анелия Венева Янчева**, доцент в Агробиоинститут, ССА, представен за присъждане на научната степен „**Доктор на науките**“. Доц. д-р Янчева участва в конкурса с всички изискуеми документи представени на хартиен и електронен носител, копия от научните ѝ трудове, както и одобрен протокол от проведено предварително обсъждане на дисертационния труд пред разширен научен състав на първичното научно звено на отдел „Функционална генетика“ от 22.04.2019. Научната продукция на кандидатката е изключително богата и напълно съответства на профила на обявения конкурс. Представените документи са подготвени в пълно съответствие със Закона за развитие на академичния състав на РБ, Правилника за развитие на академичния състав на ССА и вътрешните правилници на АБИ.

### 2. Биографични данни

Д-р Янчева е родена на 20.07.1964г. в гр. София. През 1987г. завършва висшето си образование и се дипломира като „Магистър“ в СУ „Климент Охридски“, Биологически Факултет, катедра Ботаника. Същата година постъпва на работа в Агробиоинститут, ССА. До 1996г. е редовен докторант на Агробиоинститута, а през февруари 1997г. защитава дисертация на тема: „*Регенерация и генетична трансформация на български сортове мини карамфил*“ и придобива образователната и научна степен „**Доктор**“. През 2006 доц. Янчева се хабилитира и получава научното звание ст. н.с. II ст. (доцент), шифър Генетика 01.06.06. Целият професионален стаж на д-р Янчева протича в Агробиоинститут, ССА, където се е изградила като професионален експерт в областта на биотехнологиите и растителната генетика и геномика при моделни, селскостопански и декоративни растения. От постъпването си на работа тя последователно заема различни научни позиции - от научен сътрудник I и II степен, в групата по „Функционална генетика на бобови“, до сега като доцент и ръководител на отдел „Функционална генетика“. Академичният профил на доц. д-р Янчева е одобрен от НАЦИД и публикуван в регистъра за научна дейност.

От представената документация се вижда, че д-р Янчева е провела няколко краткосрочни следдокторски специализации в престижни изследователски институти в Англия, Франция и Белгия което е допринесло за повишаване на професионалните ѝ научни знания и умения. Кандидатката има и множество участия в международни конгреси, конференции и семинари - Италия, Словакия, САЩ, Франция, Англия, Португалия, Тунис, Белгия, Турция, Гърция, Молдова и Австрия.

Кариерното и научно развитие на доц. д-р Янчева, като международно разпознат учен, проличава и от участието ѝ в организиране и провеждане на международни практически курсове провеждани от ICGEB, ICRO-UNESCO и IAEA по различни програми в областта на биотехнологиите, генетична трансформация при висши растения, цитогенетика и мутагенез. Член е на СУБ, EPSO и организатор и лектор в международни курсове – 2001-ICRO-UNESCO, 2009-

IAEA и в рамките на три години е била член на Изпълнителния съвет на ФНИ. Високите научни умения и изследователска активност на д-р Янчева намират отражение в ръководство и участие в международни и национални проекти. В момента тя е ръководител на два Европейски проекта по програма Хоризонт 2020 и по дейности МСК, както и на проект към ССА. Била е ръководител на проект финансиран от фонд „ Научни изследвания” МОН, на проект към ССА, била е участник в два международни проекта в рамките на РП5 и РП6 на ЕС. Тук искам да отбележа, че ръководство и участия в международни проекти на ЕС говорят за отличен професионализъм, което се потвърждава и от избора ѝ за член на комисията за подбор на докторанти и пост-докторанти за едномесечни обучения във високотехнологични комплекси по проект на МОН “Наука и бизнес”. Многократно е избирана за рецензент на научни статии публикувани в международни списания с импакт фактор и за рецензент в конкурси за докторанти и хабилитиране.

### **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Има няколко важни причини представителите на сем. Бобови, включващо разнообразие от растения с висока икономическа стойност - соя, люцерна, детелина, грах, фъстъци и други зърнени и фуражни бобови, да бъдат подложени на интензивен генетичен и молекулярен анализ и геномите им да бъдат секвенирани. Бобовите култури доставят критичното ниво от белтъчини и калории за хората и за животинския свят и се използват също за производство на растителни масла. При тях са намерени много уникални метаболити с биомедицинско приложение, като изофлавоноиди и растителни стероли. Друг основен принос на бобовите култури е способността им да фиксират атмосферния азот в земеделските екосистеми, което ограничава необходимостта от прилагането на химически азотни торове, а това пък допринася до устойчиво и екологично селско стопанство. През последните години, секвенирането на генома на *Medicago truncatula* е ускори разработването на маркерни системи и идентифициране на гени семейства с приложно значение.

Научно-изследователската дейност и интереси на д-р Янчева в АБИ, ССА, са изцяло фокусирани върху научно-приложни и фундаментални изследвания, а именно регулация на генната експресия, симбиотични взаимоотношения, функционална и сравнителна геномика на бобови растения. Генетичните изследвания в тази област са от особена важност, тъй като те ще осигурят мощни средства да се подобрят агрономичните и хранителни качества на тези култури, така необходими за поддържането и подобряването на хранителния статус на хората и ще допринесат за създаване на следваща генерация от качества и нов генетичен модел за цялото сем. Бобови. От тук произлиза и изключителната актуалност и целесъобразност на поставената цел и задачи на разработвания научен труд, посветен на едно сравнително ново направление, а именно изследвания върху геномиката на създадени моделни, трансгенни растения с модифицирана експресия *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*. Резултатите от тази дисертация дават ясна представа за значимостта на изследваните трансгенни култури, за разбиране на биологичната им роля и възможностите за екстраполиране на резултатите за нови стратегии за подобряване агрономическите характеристики не само на сем. Бобови, но и на други култури. Ясно формулираната цел на този научен труд е изцяло постигната с поставянето и успешното извеждане на 10 задачи, като последната задача е разделена на 6 подзадачи. Проведените изследвания от доц. Янчева са в пълно съответствие с приоритетите на Европейските програми и стартират с участието ѝ в проект по Пета рамкова програма на Европейския съюз. Някои от постигнати оригинални резултати на доц. Янчева, са принос към изясняване на проблема как геномните изследвания имат висока научна стойност и пряко отношение към практиката.

### **3. Познание на проблема**

От компетентно написания и лесно възприемаш се литературен обзор става ясно, че авторката познава в дълбочина състоянието на проблема. Той е написан на приблизително 40 страници, с много добре онагледени цветни фигури, на базата на 501 творчески оценени литературни източници. Литературният преглед е представен в шест раздела, разглеждащи и обхващащи пълно описание на растителна регенерация чрез соматичен ембриогенез, генетична трансформация, инсерционен мутагенез, права, обратна и функционална генетика на изследваните моделни растения. Данните от литературната справка са представени в ясна последователност и са обобщени от докторантката със знания представящи публикуваното до момента и възможности за бъдещи научни приложения. В детайли са изяснени проблемите и перспективите на генетичната трансформация и функционалната геномика при растенията. При проучванията са обхванати основните методи за създаване на колекции от мутанти чрез инсерционен мутагенез, които подпомагат дешифрирането на функцията на ключови гени отговорни за развитието на растенията. Не на последно място д-р Янчева умело съпоставя собствените си резултати с публикуваните и е видно, че постигнатите от нея оригинални приноси имат достойно място в богатия литературен анализ. Публикуваната информация е представена стегнато и критично и това позволява на авторката точно да формулира целта и задачите за нейното постигане.

### **5. Методика на изследването**

Впечатляващ е броят от приложени и много добре описани материали и методи на 43 стандартни страници, с приложени цветни фигури и таблици онагледяващи и позволяващи полесното възприемане на съответните протоколи. Експериментите в раздел соматичен ембриогенез на настоящата дисертация са проведени с едногодишни диплоидни видове от род *Medicago* - *M. truncatula*, *M. orbicularis*, *M. littoralis*, *M. murex* и *M. polymorpha* и тетраплоидна многогодишна дива люцерна *Medicago falcata*. Представените оригинални резултати в този научен труд са получени благодарение на усвоени и професионално приложени методи, включващи почти всички методи на растителните *in vitro* биотехнологии, на класическата и молекулярната генетика, съвременни микроскопски, генетични, клетъчно-биологични, хистологични и статистически техники. Статистическите резултати са оценени с ANOVA тест, а стойностите от размера на генома са анализирани с one-way ANOVA и Newman-Keuls multiple-comparison means test. Разработените експериментални системи от доц. Янчева за директен и индиректен соматичен ембриогенез при моделните растения, представени в настоящия дисертационен труд, са обобщени в глава от книга посветена на соматичния ембриогенез, първо издание на ръководство за моделното растение *M. truncatula*, и обзорно ревю. Трансформацията на суспендиални клетъчни култури от *Medicago truncatula* е извършена с прилагането на иновативен метод, позволяващ рутинното му използване при анализи за функционална активност на конструираните гени за генен пренос и възможност да се генерират трансгенни растения от единични клетки или клетъчни кълъстери. Последното е предпоставка той да бъде включен във второто издание на *M. truncatula* handbook (Iancheva and Revalska 2019), като нов метод за генен пренос при моделното растение.

С подбраните техники е постигната поставената цел и е получен адекватен отговор на задачите, разрешени в дисертационния труд.

### **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Най-важната част „Резултати и обсъждане“ са представени на около 140 страници и завършват със заключение където на две страници много достъпно и синтезирано са дискутирани получените приноси. Този раздел съдържа 7 глави в които, последователно на поставените задачи, са описани, обсъдени и прекрасно онагледени получените резултати отразяващи натрупването и надграждането на знания получени при изследване на моделното растение за



сем. Бобови *M. truncatula*, както и включените още два моделни вида *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*. С разработени ефективни протоколи за клетъчни суспендиални култури при *M. falcata* и *M. truncatula* д-р Янчева е доказала асиметрията на първото клетъчно делене, с което стартира процеса на директен соматичен ембриогенез и е проследила процеса на растително развитие от една клетка до цяло растение, което е от значение при изучаване на ранните събития – първо асиметрично клетъчно делене, индуциране на ембриогенен потенциал и соматични ембриониди произхождащи от единични клетки. Тези данни са принос за проследяване и изясняване в динамика на експресията и ролята на ключови гени през целия процес на развитие на растението. Наличието на регенерация от клетъчни суспендиални култури, е възможност за разработване на системи за генен пренос и произход на трансгенни растения от единични трансформирани клетки. С прилагането на този протокол тя е създала и стабилни трансгенни растения за анализ на промоторната активност, включващи маркерни гени за  $\beta$ -глюкозонидазна активност (GUS) и зелен флуоресцентен белтък (GFP) под контрола на ендогенните промотори на двата изследвани гена.

За първи път, чрез флоуцитометричен анализ, д-р Янчева установява размера на генома и хромозомния брой на диплоидни видове от род *Medicago*, с произход от Алжир, и доказва наличие на връзка между размера на генома и компетентността за индуциране на директен соматичен ембриогенез в течна среда. От резултатите за връзката между размера на генома и способността за индуциране на ембриогенен отговор доц. Янчева установява, че *Medicago orbicularis*, притежаващ най-малък геном, формира соматични ембриониди за най-кратък период, отличава се с най-висок процент на реагирани експланти и брой соматични ембриониди за експлант.

В следващите два раздела III и IV доц. Янчева представя пионерни за страната ни резултати свързани със създаване на ценна колекция от Tnt1 инсерционни мутанти при *M. truncatula* и на малка колекция от Tnt1 инсерционни мутанти при *Lotus japonicus*. Първата стъпка за създаване на обширна колекция от инсерционни мутантни линии от *M. truncatula* cv. Jemalong е доказателството, че ретротранспозона Tnt1 се активира по време на *in vitro* регенерацията. Подвижните генетични елементи се отнасят към групата на ретротранспозоните. Откриването и генетичното характеризиране на подвижните генетични елементи, познати още като транспозони, доведе до революция в разбирането ни на състава и динамичния потенциал на генетичния материал почти при всички организми. Гласък за този внезапен, голям напредък беше даден още преди 50 години, когато транспозонни елементи бяха открити в царевичата (*Zea mays*) и бяха характеризирани някои аспекти на тяхното генетично поведение. Тези елементи могат да се движат във и между хромозомите, където те могат да променят генината експресия или да служат като места за хромозомни скъсвания или пренареждания и да доведат до геномни и гени мутации. Ретротранспозоните са задължителни компоненти на еукариотния геном, играят важна роля, както в организацията, така и в еволюцията му и дават възможност да се разберат механизмите, чрез които те повлияват геномната организация. Доц. Янчева е установила, че всички скринирани Tnt1 мутанти показват значителни разлики в морфологията на листата, което доказва, че Tnt1 е много ефективен мутаген, а Tnt1 маркирането е една от най-ценните системи за функционална геномика на бобовите растения. Този подход на изследване е основен в стратегията на „правата генетика“. Създадената от д-р Янчева колекция от инсерционни мутантни линии е ценен ресурс за изследователи по функционална геномика на бобови растения. С тези ново въведени протоколи за регенерация при създаването на трансгенни растения при бобови, с методите на правата и обратна генетика, доц. Янчева поставя началото за изследванията по функционална геномика.

За първи път доц. Янчева открива нов ретроелемент MERE1-1 в генома на мутантни линии от *M. truncatula*, и доказва транспозицията му по време на *in vitro* регенерация. *Medicago*

*truncatula* copia-like ретроелемента MERE1-1 е установен като инсерция в симбиотичния ген NSP2. Ретроелемента MERE1-1 принадлежи към нискокопийно семейство ретротранспозони в генома на *M. truncatula* и е още една алтернатива за увеличаване на броя на инсъртите в генома на мутантните линии от *M. truncatula*.

Д-р Янчева представя убедителни доказателства за участието на редица гени (MtLAX3; MtARFB3; MtF-box; MtHAC; MtGRAS; MtDRP), които до сега не са проучвани, при протичане на процеса на директен соматичен ембриогенез в различни негови стадии при *M. truncatula*. Тези гени са подбрани за клониране и изследване на функцията им по време на развитието на *M. truncatula*, *L. japonicus*, и *Arabidopsis thaliana*, защото участват в основни процеси като вторично коренообразуване, зреене на семената, симбиотична азотфиксация и соматичен ембриогенез и др. Получените резултати са предпоставка за бъдещи изследвания за проследяване на функционалната връзка на изследваните гени в контекста на процеса и по време на клетъчната де-диференциация и последващата диференциация.

В следващия раздел за първи път докторантката е показала важни резултати от комплексно сравнително функционално изследване на ген кодиращ F-box белтък (Cyclin like F-box protein) в моделните растения *M. truncatula* и *A. thaliana*. При *A. thaliana* са изследвани и функционално характеризирани по-малко от 5% от F-box белтъците. Тези белтъци са включени в регулацията на сложните процеси на развитие, като разклоняване и стареене на листата, развитие на цвета, сигнален път на фитохормоните, циркаден ритъм и защитни отговори на растенията. Д-р Янчева е доказала участието на гена кодиращ F-box белтък в клетъчния цикъл и при двете моделни растения, което предполага ролята му в деградирането на ключови протеини от клетъчния цикъл. В резултат от проведен ТАР анализ /Тандемно Афинитетно Пречистване/ за установяване на взаимодействие на ниво протеин е излъчен общ директен интерактор на гена кодиращ F-box белтък. В транскриптомни експерименти д-р Янчева е установила експресионния му профил в трансгенни растения с модифицирана експресия.

В дисертацията си д-р Янчева представя и други резултати заслужаващи определен интерес. От многобройни, трудоемки, правилно планирани и последователно осъществени експерименти за първи път д-р Янчева провежда изследвания върху изясняване ролята на някои епигенетични механизми в геномите на удачно подбраните трансгенни растения. Докторантката представя данни за функциите на хистон ацетилтрансферазен ген HAC1 в потомството на трансгенни растения с модифицирана експресия на HAC1, при моделните растения *M. truncatula*, *L. japonicus*, и *A. thaliana* и установява съществени фенотипни отклонения и при трите, което потвърждава участието на този ген в растежа и развитието на растителните органи. Това са нови, получени за първи път доказателства за консервативната роля на хистон ацетилтрансферазния ген HAC1.

От приносите с приложна стойност високо оценявам създадения протокол за генетична трансформация на клетъчни суспендиални култури от *M. truncatula*, позволяващ регенериране на стабилни трансгенни растения от единични клетки. Създаденият протокол за трансформация на суспендиални клетъчни култури предоставя възможност за охарактеризиране на специфични генни функции и ключови етапи от развитието на бобовите растения. Чрез този метод на генетична трансформация д-р Янчева е конструирала стабилни, фертилни трансгенни растения от *M. truncatula* – свръхекспресиращи MtF-box-GFP, и растения експресиращи маркерните гени за глюкоронидазна активност (GUS) и зелен флуоресцентен белтък (GFP) от изследваните гени pMtARFB3::GUS-GFP, pMtGRAS::GUS-GFP, pMtLAX3::GUS-GFP. Получените стабилни, фертилни трансгенни растения чрез индиректен соматичен ембриогенез от *M. truncatula* с модифицирана експресия и промоторни растения експресиращи маркерните гени GUS и GFP под контрола на ендогенни промотори от изследваните гени са ценен ресурс в изследванията по функционална геномика и актив за бъдещата експериментална работа.

В научния си труд доц. Янчева е постигнала друг принос с приложно значение. Тя е разработила система за синхронизиране на меристемни клетки от коренови връхчета от *M. truncatula* подпомагаща изследвания на клетъчния цикъл. Тази система предоставя възможност да се изследват гени в ендегенно стабилни условия и при унифицирани меристемни клетки и е използвана за позиционирането и определяне на предполагаемата роля на проучвания Mt-F-box ген при протичане на клетъчния цикъл.

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

Изследванията, отразени в научния труд на доц. Янчева, имат подчертано научен и научно-приложен характер. Приемам формулираните от авторката 7 фундаментални приноси и 2 с научно-приложение в практиката. Искам да отбележа, че всички приноси са насочени към разработване на теоретични и методични подходи за създаване на подобрени култури, което е една важна стопанска задача от областта на генетиката. От тях, особено внимание трябва да се отдели на резултатите получени за първи път с нови средства, конструкти и техники, които несъмнено са основа за бъдещо приложение при селскостопанските култури. С приложените фенотипни, морфометрични, транскриптомни, протеомни и метоболомни анализи д-р Янчева е постигнала поставената цел и е успяла да докаже, че информацията от тези моделни растения може да бъде пренесена и да намери устойчиво приложение при културните растения с икономическо значение. Приложението на тези резултати са важна стъпка в разбиране на процеса на растеж и развитие и подобряване хранителните характеристики на важни за човека и животните агрокултури.

### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Успешното изучаване функциите на отделните гени и техните взаимодействия се извършва с помощта на създаване на трансгенни организми, като за целта се използват добре разработени и секвенирани модели с малък геном и къс цикъл на развитие. Дисертационният труд на доц. д-р Янчева е фокусиран върху създаване и изследване на трансгенни растения от моделни бобови култури. Дисертацията е написана на 315 страници. Поради многобройните данни, за да улесни възприемането им, авторката ги допълва с две приложения на около 40 страници. Оформена е по класическия начин с Увод, Цел и Задачи, Материали и Методи, Резултати и Дискусия, Заключение, Изводи и Приноси. Илюстрирана е със 71 фигури и 23 таблици. Монографичната справка съдържа 501 литературни източници, голяма част от които са от последните 10-15 години. Доц. Янчева представя списък с 13 публикации, изцяло по темата на дисертацията, като 11 от тях са публикувани в международни високо индексирани списания и 2 в монографични издания, споменати по-горе. В 12 от публикациите доц. Янчева е водещ автор /първи и последен/. Знае се, че критериите за водещ автор включват създаване на идеи и/или хипотези, тяхното методично изпълнение, както и осигуряване на финансово обезпечаване за извършване на експерименталната работа. В тази връзка, отреденото място в публикациите на кандидатката безспорно показва отговорността и личното ѝ участие. Представените трудове са цитирани 51 пъти. Д-р Янчева е ръководител и участник на международни проекти финансирани по Европейски програми, както и ръководител и участник в национални проекти финансирани от Фонда за научни изследвания към МОН и от ССА, което е допринесло не само за нейния, но и за националния и международен престиж на АБИ.

### **9. Лично участие на докторантката**

От цялостния преглед на представените данни в дисертационния труд на доц. Янчева, безусловно мога да кажа, че те са реални нейни постижения, благодарение на личното ѝ участие в изпълнението на целта и задачите. Получените от нея резултати са обобщени в 16 извода, 7 фундаментални приноси и 2 приноса с научно приложна стойност, които са в съгласие с получените резултати и отразяват оригиналността на разработката.



### 10. Автореферат

Авторефератът е изготвен по възприетите стандарти и дава пълна представа на основните постижения и приноси на дисертацията.

### 11. Критични забележки и препоръки

Нямам критични забележки и препоръки към проведеното научно изследване.

### 12. Лични впечатления

Личните ми впечатления от доц. Янчева са основани от съвместните ни срещи и обсъждания на докторски теми на докторанти на АБИ. Тя винаги се е представяла като учен с отлични познания, възможности и амбиция за научна работа. Проследявайки развитието на д-р Янчева и базирайки се на нейните постижения, установявам че тя непрекъснато развива и обогатява тематиката на научните си изследвания. Постигнатите от нея успехи са резултат и от уменията ѝ за организиране на международни научни прояви и добра комуникация.

### 13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Фундаменталните открития в биологията се основават на моделните трансгенни растителни видове, а натрупаната при тях информация може да бъде пренесена при културните растения с икономическо значение. Чрез директен и индиректен соматичен ембриогенез доц. Янчева е получила ключови резултати в областта растителната регенерация, които са основа за разработването на ефективни и оригинални протоколи за генетична трансформация при моделните бобови растения. Знанието, придобито от моделното растение *M. truncatula* може да бъде прехвърлено към близко-родствени бобови - люцерна и детелина. Искам да отбележа, че постигнатите резултати поставят доста възможности за бъдещи проучвания и практически приложения за подобряване на селскостопанските култури. Натрупаните знания при изследваните моделни растения от този научен труд могат да предложат внедряване на нова технология за подобряване на културните растения и да намалят екологичния риск обогатявайки почвите с естествени азотни торове.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецензираният дисертационен труд представлява хомогенен синтез от ясно и точно формулирана цел, умело поставени и отлично изпълнени задачи, чудесно онагледени резултати получени с прилагането на множество най-съвременни техники. Доц. Янчева притежава богат изследователски, експериментален и организационен опит в широк спектър на най-съвременни направления. Резултатите ѝ представляват принос както в българската, така и в световната наука. Този научен труд **съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България. Правилника за неговото прилагане и съответните Правилници на Агробиоинститута към ССА. Дисертационният труд показва, че авторката му доц. д-р Анелия Янчева **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Генетика“ като демонстрира качества и умения видни от високите наукометрични показатели.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „Доктор на науките“** на доц. д-р Анелия Венева Янчева.

София, 20.09.2019 г.

Рецензент:

Проф. доктор Елена Георгиева.

## REFEREE REPORT

by Prof. Elena Ivanova Georgieva PhD

of "Doctor of Science" Thesis in the field of higher education: 4. "Natural Sciences, Mathematics and Informatics"; professional area: 4.3. Biological Sciences, Scientific speciality "Genetics"

Author: Assoc. Prof. Anelia Veneva Iantcheva, PhD

Topic: "The role of the model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* in research on plant biotechnology and functional genomics of Bobov"

### 1. General description of the materials presented

By order No. ПД-05-158 / 02.08.2019 of the President of the AA I was appointed as a member of the scientific jury for providing a procedure for the defence of the dissertation work of Anelia Veneva Iantcheva, associate professor at the Agrobioinstitute, AA, presented for the award of the scientific degree "Doctor of Science". Assoc. Prof. Dr. Iantcheva participates in the competition with all required documents presented in paper and electronic form, copies of her scientific publications, as well as an approved protocol from the preliminary discussion of the dissertation in front of an extended scientific staff of the primary scientific unit of Department of Functional Genetics on 04/22/2019. The scientific production of the candidate is extremely rich and fully fits the profile of the announced competition. The submitted documents have been prepared in full compliance with the Law on the Development of the Academic Staff of the Republic of Bulgaria, the Rules for its implementation on Agricultural Academy.

### 2. Biographical data

Dr. Iantcheva was born on 20.07.1964 in Sofia. In 1987 she graduated University of Sofia "Kliment Ohridski" Faculty of Biology, holding a master's degree from the Department of Botany. The same year she joined the Agrobioinstitute, AA. Until 1996 she is a full-time PhD student from the Agrobioinstitute and in February 1997 she defended her dissertation on the topic: "Regeneration and genetic transformation of Bulgarian varieties of spray carnation" and obtained educational and scientific degree "Doctor". In 2006 Anelia Iantcheva was habilitated and received the scientific degree Assoc. Prof. (Associate professor), cipher "Genetics" 01.06.06. Dr. Iantcheva's entire professional experience takes place at the Agrobioinstitute, AA, where she has established herself as a professional expert in the field of biotechnology and plant genetics and genomics in model, agricultural and ornamental plants. Since her employment she has consistently occupied various scientific positions - from research associate I and II, in the group "Functional genetics of legumes" until today as an assistant professor and head of the department "Functional Genetics". The academic profile of Assoc. Prof. Dr. Iantcheva is approved by the NACID and published in the scientific activity register.

The documentation provided shows that Dr. Iantcheva has undertaken several short-term postdoctoral specializations at prestigious research institutes in England, France and Belgium, which have contributed to her professional and scientific knowledge and skills. The candidate also has numerous participations in international congresses, conferences and seminars - Italy, Slovakia, USA, France, England, Portugal, Tunisia, Belgium, Turkey, Greece, Moldova and Austria.

The career and scientific development of Assoc. Prof. Dr. Iantcheva, as an internationally recognized scientist, is evident from her participation in organizing and conducting international practical courses conducted by ICGEB, ICRO-UNESCO and IAEA on various programs in the field of biotechnology, genetic transformation in higher plants, cytogenetics and mutagenesis. She is a member of USB, EPSO and organizer and lecturer in international courses - 2001-ICRO-UNESCO, 2009- IAEA, has been a member of the BNSF Executive Board for three years. Dr. Iantcheva's high



scientific skills and research activity are reflected in leadership and participation in international and national projects. She is currently the manager of two European projects under Horizon 2020 and under MSC activities, as well as a project at AA. She was a project manager of a project funded by the BNSF, and a project in the frame of the AA, and has been a participant in two international projects under FP5 and FP6 of the EU. I would like to point out here that leadership and participation in EU international projects speak of excellent professionalism, which is confirmed by her election as a member of the Commission for the selection of doctoral and post-doctoral students for one-month training in research high-tech complexes of under the program "Science and Business" of the MES". She has been repeatedly selected as a peer reviewer for scientific articles published in international journals with Impact Factor and for peer review in doctoral and habilitation competitions.

### **3. The relevance of the topic and the appropriateness of the goals and objectives set**

There are several important reasons why representatives of the legume family, including a variety of plants of high economic value - soybean, alfalfa, clover, peas, peanuts and other cereals and fodder legumes - may be subjected to intensive genetic and molecular analysis and genomes to be sequenced. Legumes supply the critical level of protein and calories for humans and animals and are also used to produce vegetable oils. Many unique metabolites with biomedical applications such as isoflavones and plant sterols have been found in legumes. Another major contribution is their ability to fix atmospheric nitrogen in agricultural ecosystems, which limits the need for chemical nitrogen fertilizers, in turn contribute to sustainable and environmentally friendly agriculture. In recent years, sequencing of the *Medicago truncatula* genome has accelerated the development of marker systems and the identification of gene families of relevance.

Dr. Iantcheva's research activities and interests at ABI, AA are entirely focused on applied science and basic research, namely regulation of gene expression, symbiotic relationships, functional and comparative genomics of legumes. Genetic studies in this field are of particular importance as they will provide powerful means to improve the agronomic and nutritional qualities of these crops necessary to maintain and improve the nutritional status of humans and contribute to the creation of the next generation of traits and a new genetic model for the whole legume family. Hence the exceptional relevance and appropriateness of the set purpose and tasks of the developed scientific work devoted to a relatively new direction, namely, studies on the genomics of created model, transgenic plants with modified expression *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*. The results of this dissertation give a clear idea of the importance of the transgenic crops studied, the understanding of their biological role and the possibilities for extrapolating the results to new strategies for improving agronomic characteristics not only of legumes, but also of other crops. The clearly stated purpose of this scientific work has been fully achieved by the setting and successful completion 10 tasks, the last task being divided into 6 sub-tasks. The research conducted by Assoc. Prof. Iantcheva is in full accordance with the priorities of the European programs and started with her participation in a project under the Fifth Framework Program of the European Union. Some of the original results of Assoc. Prof. Iantcheva have contributed to clarifying the problem of how genomic research possesses high scientific value and direct relevance to practice.

### **4. Knowledge of the problem**

From the expertly written and easily understood literary review it is clear that the author knows in depth the status of the problem. It is written in approximately 40 pages, with very well illustrated colour figures, based on 501 creatively appreciated literature sources. The literature review is presented in six sections, covering a complete description of plant regeneration through

somatic embryogenesis, genetic transformation, insertional mutagenesis, forward, reverse and functional genetics of the model plants studied. The data in the literature are presented in a clear sequence and are summarized by the author with knowledge of what has been published and the possibilities for future scientific applications. The problems and prospects of genetic transformation and functional genomics in plants are explained in detail. The studies cover the main methods for creating mutant collections by insertional mutagenesis that help decipher the function of key genes responsible for plant development. Last but not least, Dr. Iantcheva skilfully compares her own results with those published and it is clear that the original contributions she has made have a worthy place in the rich literary analysis. The published information is presented concisely and critically, and this allows the author to formulate precisely the purpose and tasks for achieving it.

## 5. Research methodology

The number of applied and meticulously described materials and methods on 43 standard pages, with colour figures and tables attached, illustrating and enabling easier acceptance of the relevant protocols. The experiments in the somatic embryogenesis section of this dissertation were performed with annual diploid species of the genera *Medicago* - *M. truncatula*, *M. orbicularis*, *M. littoralis*, *M. murex* and *M. polymorpha*, and tetraploid perennial alfalfa *Medicago falcata*. The original results presented in this scientific work have been obtained thanks to assimilated and professionally applied methods, including almost all methods of plant *in vitro* biotechnology, classical and molecular genetics, modern microscopy methods, genetics, cell biology, histology and statistical techniques. Statistical results were evaluated with an ANOVA test, and genome size values were analysed with a one-way ANOVA and Newman-Keuls multiple-comparison means test. The experimental systems developed by Assoc. Prof. Iantcheva for direct and indirect somatic embryogenesis in the model plants presented in this dissertation are summarized in a chapter on a book on somatic embryogenesis, the first edition of a handbook to the model plant *M. truncatula*, and an overview. Transformation of suspension cell cultures by *Medicago truncatula* was performed using an innovative method allowing its routine use in analyses of the functional activity of gene transfer constructs and the ability to generate transgenic plants from single cells or cell clusters. The latter is a prerequisite for its inclusion in the second edition of *M. truncatula* handbook (Iantcheva and Revalska 2019) as a new method of gene transfer in the model plant.

The selected techniques achieved the goal and received an adequate response to the tasks allowed in the dissertation.

## 6. Characterization and evaluation of the thesis

The most important part "Results and Discussion" is presented in roughly 140 pages and ends with a conclusion where the contributions received are discussed in a very accessible and synthesized way. This section contains 7 chapters which, in succession of the tasks assigned, describe, discuss, and perfectly illustrate the results obtained reflecting the accumulation and upgrading of knowledge gained in the study of the model plant for legumes *M. truncatula*, as well as two other species of *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* included. By developing effective cell suspension culture protocols for *M. falcata* and *M. truncatula*, Dr. Iantcheva has demonstrated the asymmetry of the first cell division, initiating the process of direct somatic embryogenesis and tracing the process of plant development from one cell to the whole plant, which is important in the study of early events - first asymmetric cell division, induction of embryogenic potential and somatic embryos originating from single cells. These data contribute to tracing and clarifying the dynamics of expression and the role of key genes throughout the plant development process. The presence of regeneration from cell suspension cultures is an opportunity to develop systems for gene transfer and origin of transgenic plants from single transformed cells. Using this protocol, she also



created stable transgenic plants for analysis of promoter activity, including marker genes for  $\beta$ -glucuronidase activity (GUS) and green fluorescent protein (GFP) under the control of the endogenous promoters of the two genes tested.

For the first time, through flow cytometric analysis, Dr. Iantcheva determined the genome size and chromosomal number of *Medicago* diploid species, originating in Algeria, and demonstrated a relationship between genome size and competence for induction of direct somatic embryogenesis in liquid medium. From the results on the relationship between genome size and the ability to induce an embryogenic response, Assoc. Prof. Iantcheva finds that *Medicago orbicularis*, possessing the smallest genome, forms somatic embryos for the shortest period, with the highest response rate of explants and the number of somatic embryos per explant.

In the next two sections III and IV, Assoc. Prof. Iantcheva presents pioneering results for the creation of a valuable collection of *Tnt1* insertion mutants in *M. truncatula* and a small collection of *Tnt1* insertion mutants in *Lotus japonicus*. The first step is to create an extensive collection of insertion mutant lines from *M. truncatula* cv. Jemalong is evidence that retrotransposon *Tnt1* is activated during *in vitro* regeneration. Mobile genetic elements belong to the group of retrotransposons. The discovery and genetic characterization of mobile genetic elements, also known as transposons, has revolutionized our understanding of the composition and dynamic potential of genetic material in almost all organisms. The impetus for this sudden, great progress was made 50 years ago, when transposon elements were discovered in maize (*Zea mays*) and some aspects of their genetic behaviour were characterized. These elements can move in and between chromosomes, where they can alter gene expression or serve as sites for chromosomal breaks or rearrangements and lead to genomic and gene mutations. Retrotransposons are obligatory components of the eukaryotic genome, play an important role both in organization and in its evolution and make it possible to understand the mechanisms by which they affect the genomic organization. Assoc. Prof. Iantcheva found that all the screened *Tnt1* mutants showed significant differences in leaf morphology, which proves that *Tnt1* is a very effective mutagen, and *Tnt1* marking is one of the most valuable systems for the functional genomics of legumes. This research approach is fundamental to the strategy of 'forward genetics'. Dr. Iantcheva's collection of insertion mutant lines is a valuable resource for researchers in the functional genomics of legumes. With these newly introduced protocols for regeneration in the creation of transgenic plants in legumes, using the methods of forward and reverse genetics, Assoc. Prof. Iantcheva initiates the studies in functional genomics.

For the first time Assoc. Prof. Iantcheva discovered a new retro element MERE1-1 in the genome of mutant lines from *M. truncatula* and proved its transposition during *in vitro* regeneration. *Medicago truncatula* copia-like retroelement MERE1-1 has been identified as an insertion into the symbiotic *NSP2* gene. The MERE1-1 retroelement belongs to a low-copy family retrotransposons in the genome of *M. truncatula* and is another alternative for increasing the number of insertions in the genome of mutant lines from *M. truncatula*.

Dr. Iantcheva presents conclusive evidence for the involvement of a number of genes (MtLAX3; MtARFB3; MtF-box; MtHAC; MtGRAS; MtDRP), which have not yet been studied, in the course of the indirect somatic embryogenesis process at various stages of *M. truncatula*. These genes are selected for cloning and study of their function during the development of *M. truncatula*, *L. japonicus*, and *Arabidopsis thaliana* because they participate in basic processes such as secondary rooting, seed maturation, symbiotic nitrogen fixation, and somatic embryogenesis, etc. The results obtained are a prerequisite for future studies to monitor the functional linkage of the studied genes in the context of the process and during cellular dedifferentiation and subsequent differentiation.



In the next section, for the first time, Dr. Iantcheva showed important results from a comprehensive comparative functional study of a Cyclin like F-box protein gene in model plants *M. truncatula* and *A. thaliana*. In *A. thaliana*, less than 5% of F-box proteins have been tested and functionally characterized. These proteins are involved in the regulation of complex developmental processes, such as leaf branching and senescence, color development, phytohormone signalling pathways, circadian rhythm, and plant defence responses. Dr. Iantcheva has demonstrated the involvement of the gene encoding the F-box protein in the cell cycle in both model plants, suggesting its role in the degradation of key cell cycle proteins. As a result of a TAP analysis (Tandem Affinity Purification) to detect protein:protein interaction, a common direct interactor of the gene encoding the F-box protein was emitted. In transcriptomic experiments, Dr. Iantcheva established his expression profile in transgenic plants with modified expression.

In her dissertation, Dr. Iantcheva presents other results worthy of interest. From numerous, time-consuming, properly planned and sequentially implemented experiments, Dr. Iantcheva conducted studies for the first time to clarify the role of some epigenetic mechanisms in the genomes of successfully selected transgenic plants. She presents data on the functions of the histone acetyltransferase gene *HAC1* in the offspring of transgenic plants with modified expression of *HAC1*, in model plants *M. truncatula*, *L. japonicus*, and *A. thaliana*, and found significant phenotypic abnormalities in all three, confirming participation of this gene in the growth and development of plant organs. These are new, first-time, evidence of the conservative role of the histone acetyltransferase gene *HAC1*.

From the contributions of applied value, I highly appreciate the established protocol for the genetic transformation of cell suspensions of *M. truncatula*, allowing the regeneration of stable transgenic plants from single cells. The established protocol for the transformation of suspension cell cultures provides an opportunity to characterize specific gene functions and key stages in the development of legumes. Through this method of genetic transformation, Dr. Iantcheva constructed stable, fertile transgenic plants of *M. truncatula* - overexpressing MtF-box-GFP, and transcriptional reporter plant expressing marker genes for glucuronidase activity (*GUS*) and green fluorescent *GFP* under the control of endogenous promoters from investigated genes (pMtARFB3 :: *GUS*-*GFP*, pMtGRAS :: *GUS*-*GFP*, pMtLAX3 :: *GUS*-*GFP*). Obtained stable, fertile transgenic plants by indirect somatic embryogenesis from *M. truncatula* with modified expression and promoter plants expressing the *GUS* and *GFP* marker genes under the control of endogenous promoters from the studied genes are a valuable resource in functional genomics studies and future experimental work.

In her scientific work, Assoc. Prof. Iantcheva has made other contributions of applied importance. It has developed a system for synchronization of meristem cells from root tips of *M. truncatula* to support cell cycle studies. This system provides the ability to investigate genes in endogenously stable conditions and under unified meristem cells, and this system has been used to position and determine putative role of the investigated Mt-F-box gene in the course of the cell cycle.

## **7. Contributions and importance of dissertation to science and practice**

The research, reflected in the scientific work of Assoc. Prof. Iantcheva, has a highly scientific and scientifically applied character. I accept the 7 fundamental contributions formulated by the author and 2 with scientific application in practice. I would like to point out that all contributions are directed towards the development of theoretical and methodological approaches for the purpose to improve crops, which is an important economic task in the field of genetics. Of these, particular attention should be paid to the results obtained for the first time with new tools, constructs and techniques, which undoubtedly form the basis for future improvement of the crops. With the applied

phenotypic, morphometric, transcriptomic, proteomic and metabolomic analyses. Dr. Iancheva achieved her goal and was able to prove that the information from these model plants can be transferred and find sustainable application in cultivated plants of economic importance. The application of these results is an important step in understanding the growth and development process and improving the nutritional characteristics of crops for the benefit of man and animal.

#### **8. Assessment of dissertation publications**

Successful study of the functions of individual genes and their interactions is accomplished through the creation of transgenic organisms, using well-designed and sequenced small-genome and short-cycle models. Assoc. Prof. Dr. Iancheva's dissertation is focused on the creation and research of transgenic plants from model legumes. The dissertation is written on 315 pages. Due to the abundance of data to facilitate their perception, the author supplements them with two applications of roughly 40 pages. It is written in the classic way with Introduction, Purpose and Tasks, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusion, Conclusions and Contributions. It is illustrated with 71 figures and 23 tables. The literature reference contains 501 sources, most of which are from the last 10-15 years. Assoc. Iancheva presents a list of 13 publications, entirely on the topic of the dissertation, 11 of which have been published in internationally high-indexed journals and 2 in the monographs mentioned above. In 12 of the publications, Assoc. Prof. Iancheva is the lead author (first and last). Lead author criteria are known to include the creation of ideas and / or hypotheses, their methodological implementation, and the provision of financial support for the experimental work. In this respect, the place given in the candidate's publications clearly shows her responsibility and her personal involvement. Publications related to the dissertation have been cited 51 times. Dr. Iancheva is a leader and participant in international projects funded under European programs, as well as a leader and participant in national projects funded by the Research Fund of the Ministry of Education and Science and the Agricultural Academy, these projects contributed not only to her, but also to ABI national and international prestige.

#### **9. Personal participation of the candidate**

From the complete assessment review of the presented data in the dissertation of Assoc. Prof. Iancheva, I can definitely say that they are real achievements, thanks to her personal involvement in the fulfilment of the purpose and tasks. The results she obtained are summarized in 16 conclusions, 7 fundamental contributions and 2 contributions of scientifically applied value, which are in accordance with the obtained results and reflect the originality of the development.

#### **10. Abstract**

The abstract is prepared according to the accepted standards and gives a complete picture of the main achievements and contributions of the dissertation.

#### **11. Critical comments and recommendations**

I have no critical remarks or recommendations for the research that was carried out.

#### **12. Personal impressions**

My personal impressions of Assoc. Prof. Iancheva are based on our joint meetings and discussions on doctoral topics by ABI doctoral students. She has always presented herself as a scientist with excellent knowledge, capabilities and ambition for scientific work. Tracking the development of Dr. Iancheva and based on her achievements, I find that she is constantly developing and enriching the topic of her research. Her successes are also the result of her ability to organize international scientific events and good communication.



### 13. Recommendations for future use of dissertation contributions and results

Fundamental discoveries in biology are based on model transgenic plant species, and the information they accumulate can be transmitted to crops of economic importance. By direct and indirect somatic embryogenesis, Assoc. Prof. Iantcheva has obtained key results in the field of plant regeneration, which are the basis for the development of effective and original genetic transformation protocols for model legumes. The knowledge gained from the model plant *M. truncatula* can be transferred to closely related legumes - alfalfa and clover. I would like to point out that the results achieved provide ample opportunity for future studies and practical applications to improve crops. The knowledge gained in the model plants under study from this scientific work may suggest the introduction of new technology to improve crop plants and reduce the risk for environment by enriching soils with natural nitrogen fertilizers.

### CONCLUSION

The peer-reviewed dissertation is a homogeneous synthesis of a clearly and precisely formulated goal, skilfully set and well-executed tasks, perfectly illustrated results obtained with the application of many state-of-the-art techniques. Assoc. Prof. Iantcheva has extensive research, experimental and organizational experience in a wide range of modern fields. Its results are a contribution to both Bulgarian and world science. This scientific work contains scientific and applied scientific results, which make an original contribution to science and meet all the requirements of the Law for the development of the academic staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its implementation and the corresponding Regulation of the Agricultural Academy. The dissertation shows that its author, Assoc. Prof. Anelia Iantcheva, possesses deep theoretical knowledge and professional skills in the scientific field of Genetics, demonstrating qualities and skills evident from high scientometric indicators.

Because of the above, I am convinced of my positive assessment of the conducted research and propose to the venerable scientific jury to award to Assoc. Prof. Anelia Veneva Iantcheva, the degree of "Doctor of Science".

Sofia, 09/20/2019

Reviewer: 

Prof. Dr. Elena Georgieva.