

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Елена Тодоровска, АгроБиоИнститут, ССА, София, член на научното жури
(Заповед на Председателя на ССА №РД 05-156/02.08.2019 г.)

върху дисертационен труд за придобиване на научна степен „Доктор на науките”,
област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност „Генетика“

Автор на дисертационния труд: доцент, д-р Анелия Венева Янчева, АгроБиоИнститут -
София, ССА

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

Дисертационният труд на доц. д-р Анелия Янчева е научна разработка в областта на един от най-актуалните проблеми, съпътстващи развитието на съвременната растителна биотехнология и геномика при моделните видове *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* и *Arabidopsis thaliana*.

През последните години вниманието на биолозите е насочено към дешифриране и охарактеризиране геномите на голям брой моделни видове и анализиране функцията на гени от различни сигнални пътища поради малките им геноми, сравнително проста генетична организация и възможност за прилагане на права и обратна генетика. Разшифроването функцията на гените при моделните видове е фундамент, който позволява прехвърляне на знанията ни за тях към културните растителни видове, които са трудни за манипулиране и изучаване обусловено от сложните им полиплоидни геноми.

В този аспект моделните бобови видове *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* са обещаващ обект за геномни изследвания, позволяващи идентифицирането на свързани с азотфиксацията, жизнения цикъл и стресовия отговор ключови генетични фактори (гени) и последващото им използване за подобряване на икономически важни бобови култури – соя, фасул, грах, леща, фъстъци и др., които съставляват повече от 30% от необходимия за изхранването на човешката популация протеин.

Дисертационният труд на доц. Янчева е дългогодишно, целенасочено и обстойно изследване по функционална и сравнителна геномика на моделни бобови растения, базиращо се на успешното участие на АгроБиоИнститут в проект по Пета рамкова програма на ЕС „Молекулярни и клетъчни основи на соматичния ембриогенез при люцерна“ (INCO-COPRNICUS – IC15-CT96-0906), в РП 5.2 „Tnt1 инсерционен мутагенез“ на проект по БРП на ЕС „Зърнено-бобови“ (FOOD-CT-2004-506223), а в следствие и като ръководител на проект по конкурс „Идеи“ към ФНИ „Интегрирана, функционална и сравнителна геномика на моделните бобови растения *Medicago truncatula* и *Lotus*

japonicus“ Обект на функционални изследвания е и моделното растение *Arabidopsis thaliana*.

В контекста на гореизложеното, актуалността на представената дисертационна работа не подлежи на съмнение. Целта е ясно дефинирана и насочена към утвърждаване на ролята на моделните бобови растения в съвременните растителни биотехнологии, използването им в сравнителната функционална геномика и значението им за разбиране на ключови аспекти на молекулярната и клетъчна биология, азотфиксацията и биологията на развитието на бобовите култури, а поставените 10 основни задачи и подзадачи са предпоставка за провеждане на задълбочени фундаментални изследвания при моделните бобови видове *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* и интензивно използваното в растителната биология моделно растение *Arabidopsis thaliana*.

Методологията включва разнообразен набор от методични инструменти и прийоми, които са основа за прецизност на проведените изследвания по сравнителна и функционална геномика, по важните от които са: разработване на протоколи за директен (ДСЕ) и индиректен (ИСЕ) соматичен ембриогенезис в течна и твърда хранителна среда и регенерация на единични ембриогенни клетки до цяло растение; генетична трансформация и отбор на стабилни трансгенни растения със свръхекспресия, подтисната експресия на ключови гени и такива, експресиращи маркерни гени GUS и GFP под контрола на ендогенни промотори на включените в изследванията гени, включително и техни потомства (T₀-T₂, а в някои случаи и T₃); морфометрична оценка на трансгенните линии, разработване на протоколи за инсерционен мутагенезис на основата на Tnt1 транспозона и създаване на колекция от мутантни линии при *M. truncatula* и *L. japonicus*, както и на основни молекулярни методи, основаващи се на PCR, обратен двустъпален PCR (IPCR), транспозон диплей PCR, изолиране, клониране и секвениране на ДНК фрагменти и биоинформатичен анализ за определяне и сравняване на секвенции, RNAi и amiRNA методи за конструиране на вектори за експресия, както и TAP (Тандемно Афинитетно Пречистване) и BiFC (Бимолекулно Флуоресцентно Комплементиране) анализи на основата на Gateway TM технологията (Invitrogen); изолиране на РНК, RT-PCR и qRT-PCR.

Дисертационната работа е пример за завършена работа, в която успешно са решени основните задачи залегнали в работната програма – доказване асиметрията на първото клетъчно делене стартиращо процеса на ДСЕ в течна културална среда и проследяване на процеса на развитие от единична клетка до цяло растение, определяне размера на генома при диплоидни видове от род *Medicago* и детерминиране на връзката между размера и компетентността за индуциране на директен соматичен ембриогенезис, получаване на стабилни трансгенни линии чрез генетична трансформация на клетъчна суспендиална култура и ИСЕ при *M. truncatula*, разработване на регенерационни протоколи за ефективен инсерционен мутагенезис на основата на Tnt1 транспозона и получаване на колекция от мутантни линии при моделните видове *M. truncatula* и *L. japonicus*, идентифициране на *MERE1* ретроелемент и доказване на транспозицията му по време на *in vitro* регенерация

на *M. truncatula*, фенотипна оценка на селектирани Tnt1 инсерционни мутантни линии в различни условия на отглеждане - *in vitro*, *in vivo*, хидропонна и аеропонна култура, конструиране на вектори за свръхекспресия, подтисната експресия и анализ на промоторната активност на гени (*MtF-box*, *GRAS*, *LAX3*, *ARFB3*, *DRP*, *HAC*), както и конструкти за (Тандемно Афинитетно Пречистване) и BiFC (Бимолекулно Флуоресцентно Комплементиране) анализи, проучване функцията на ген кодиращ *F-box* протеин при *M. truncatula* и *A. thaliana* на основата на анализи, базирани на права и обратна генетика.

Успешното реализиране на обемната и сложна научна задача, определя доц. д-р Анелия Янчева като теоретично и методологично много добре подготвен учен, който умело борави със широк набор от методични прийоми в областта на растителната биотехнология и функционална геномика. Изследванията представляват завършен цикъл от анализи, които са предпоставка за постигане на научно значими резултати, някои от които с принос към световната биологическа наука по отношение на моделните видове *M. truncatula* и *L. japonicas* и представляват своеобразен фундамент за подобряване на ценни агрономически признаци при културните бобови видове.

Подкрепям представената от доц. Анелия Янчева справка за приносите. Като оригинални и ценни за практиката и със световен принос приемам:

- Разработване на протоколи за директен и индиректен соматичен ембриогенезис при моделните бобови видове и установяване на асиметрията на първото клетъчно делене в суспендиални култури от *M. truncatula* и *M. falcata* – начален старт за процеса директен соматичен ембриогенезис и проследяване процеса на развитието до цяло растение от единична ембриогенна клетка;

- Установяване размера на генома на диплоидни видове от род *Medicago* в колекция с произход Алжир и наличие на връзка между нея и компетентността за индуциране на директен соматичен ембриогенезис в течна среда;

- Създаване на колекция Tnt1 инсерционни мутантни линии при *M. truncatula* и *L. japonicus* на основата на новоразработени протоколи за ефективна транспозиция, с което е обогатена световната генбанка с инсерционни мутантни линии за последващи геномни анализи и изолиране на гени, кодиращи агрономически ценни признаци. В това отношение получената оригинална инсерционна мутантна линия „Рибена кост“ с променена морфология на корена поради мутация в ген, свързан с грудкообразуването (*nodulin 21*) е категорично доказателство за възможностите, които предоставят инсерционните мутанти за изолиране и охарактеризиране на гени с определени функции в генома на бобовите култури;

- Идентифициране на нов ретроелемент *MERE1* в генома на мутантни линии при *M. truncatula*, който транспозира по време на *in vitro* регенерацията и може да бъде използван като маркер в бъдещи анализи, насочени към проучване на устойчивостта/резистентността на различни бобови култури към стресови фактори;

- Проведено е сравнително функционално изследване на ген, кодиращ *F-box* протеин при *M. truncatula* и *A. thaliana* на основата на фенотипни и омикс- анализи и е потвърдена неговата функция в синтеза на разклонената аминокиселина левцин и клетъчния цикъл.

Дисертационният труд е оформен съгласно изискванията на Закона на развитие на академичния състав на Р България и на Правилника за прилагането му. Дисертацията е написана на 315 страници. Литературната справка е изключително обстойна, прецизна, със съвременно звучене и е свързана с разработваните проблеми и включва 501 източника, 2/3 от които са публикувани след 2000 година, а резултатите са илюстрирани с 23 таблици и 71 фигури в основния текст и подкрепени с още 27 фигури и 2 таблици, изнесени в Приложения 1 и 2.

По дисертационния труд имам някои забележки, свързани с използваната на места терминология („промоторни растения“, „растително развитие“ и др.), които по-никакъв начин не омаловажават неговата стойност.

Във връзка с дисертацията са представени 11 публикации, от които 9 - в престижни международни списания с импакт фактор и 2 - в списания с SJR, както и глави от две книги.

Авторефератът отразява основните раздели и резултати от дисертационния труд.

Личните ми впечатления от доц. Янчева датират още от зората на формирането ѝ като специалист в областта на растителните биотехнологии, успешната защита на дисертацията за придобиване на ОНС „Доктор“ до настоящия момент и със задоволство мога да отбележа, че съществена характеристика на изследователската ѝ работа е постоянното обогатяване на методическия арсенал в съответствие с непрекъснатото осъвременяване на проблематиката и надграждане на знанията в областта на растителните биотехнологии и молекулярна биология. През годините тя се оформи като изключително отговорен изследовател и ерудиран учен, като ползотворни в това отношение са нейните специализации в Белгия и Франция и участието ѝ в международни и национални проекти, резултирали в една дългогодишна и целенасочена изследователска работа, плод на която е и предоставеният ми за становище дисертационен труд.

Към доц. Янчева имам следният въпрос – „Кои от изследваните гени при моделните видове бобови в този дисертационен труд биха били от селекционен интерес при културните такива?“

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на доц. д-р Анелия Янчева е сериозно и заслужаващо внимание изследване в областта на растителните биотехнологии и сравнителната функционална геномика, изискващо богата биологическа култура и солиден експериментален опит. Получените резултати представляват неоценим ресурс за по-нататъшни задълбочени изследвания в тази насока и прехвърляне на познанията от

моделните към културните бобови видове. Дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБългария, Правилника за неговото прилагане и Правилника на Селскостопанска Академия за придобиване на научната степен „Доктор на науките“.

Въз основа на научната и приложна значимост на получените резултати и приноси, и перспективите, които те разкриват за повишаване на ефективността на съвременните геномни подходи за решаване на въпроси от фундаментален и приложен характер **убедено** давам своята положителна оценка и си позволявам да препоръчам на Уважаемото Научно жури да присъди на доц. д-р Анелия Венева Янчева образователната и научна степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност „Генетика“.

Член на научното жури:

05.09.2019 г.

/проф. д-р Елена Тодоровска/

SCIENTIFIC OPINION

by Prof. Dr. Elena Todorovska, AgroBioInstitute, Agricultural Academy, Sofia, Member of the Scientific Jury (Order of the President of the SAA No. RD 05-156 / 02.08.2019)

on the dissertation for the degree of "Doctor of Science", Higher Education: 4, Natural Sciences, Mathematics and Informatics, Professional field 4.3 Biological Sciences, scientific specialty "Genetics"

Author of the thesis: Assistant Professor, Dr. Anelia Veneva Iantcheva, AgroBioInstitute - Sofia, AA

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

The dissertation work of Assoc. Prof. Anelia Iantcheva is a scientific work in the field of one of the most modern problems that accompany the development of modern plant biotechnology and genomics in the model species *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*.

In recent years, the attention of biologists has focused on deciphering and characterizing the genomes of a large number of model species and analysing the function of genes from different signalling pathways due to their small genomes, relatively simple genetic organization and the ability to apply forward and reverse genetics. Deciphering the function of genes in model species is the foundation that allows us to transfer our knowledge about them to cultivated plant species that are difficult to study and manipulate due to their complex polyploid genomes.

In this respect, the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* are a promising subject for genomic studies, allowing the identification of key genetic factors (genes) related to nitrogen fixation, life cycle and subsequent use to improve economically important legumes - soybeans, beans, peas, lentils, peanuts, etc., which make up more than 30% of the protein needed to feed a human population.

Assoc. Prof. Iantcheva's dissertation is a long-term, focused and comprehensive study on functional and comparative genomics of model legumes, based on the successful participation of AgroBioInstitute in a project under the Fifth EU Framework Program "Molecular and Cellular Basics of Somatic Embryogenesis" INCO-COPRNICUS - IC15-CT96-0906), in FP 5.2 "Tnt1 insertion mutagenesis" of the EU FP6 Grain Legumes project (FOOD-CT-2004-506223), and subsequently as project manager for the competition Ideas at BNSF "Integrated, Functional and Comparative Genomics of model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. The model plant *Arabidopsis thaliana* is also the subject of functional studies.

In light of the above, the relevance of the presented dissertation is beyond any doubt. The goal is clearly defined and aimed at affirming the role of model legumes in modern plant biotechnology, their use in comparative functional genomics and their importance in understanding key aspects of molecular and cellular biology, nitrogen fixation and the biology of legume development. The ten basic tasks and sub-tasks are a prerequisite for conducting in-depth basic research in the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* and the intensively used in plant biology model species *Arabidopsis thaliana*.

The methodology includes a diverse set of methodological tools and techniques that underlie the precision of comparative and functional genomics studies, the most important of which are: development of protocols for direct (DSE) and indirect (ISE) somatic embryogenesis in liquid and solid nutrition medium and regeneration of whole plant from a single embryogenic cell; genetic transformation and selection of stable transgenic plants with overexpression, inhibited expression of key genes and those expressing GUS and GFP marker genes under the control of endogenous promoters of the genes involved in the studies, including their offspring (T0-T2, and in some cases T3); morphometric evaluation of transgenic lines, development of protocols for insertion mutagenesis using *Tnt1* transposon and creation of a collection of mutant lines in *M. truncatula* and *L. japonicus*, as well as basic molecular methods based on PCR, reverse two-step PCR (IPCR), transposon display PCR, isolation, cloning and sequencing of DNA fragments and bioinformatics analysis to determine and compare sequences, RNAi and amiRNA methods for constructing expression vectors, as well as TAP (Tandem Affinity Purification) and BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) analyses based on Gateway™ technology (Invitrogen); isolation of RNA, RT-PCR and qRT-PCR. The dissertation is an example of a completed work in which the main tasks of the work program have been successfully solved - proving the asymmetry of the first cell division, which starts the process of DSE in a liquid culture medium and tracing the process of development from a single cell to a whole plant, determining the size of the genome of diploid *Medicago* species and the relationship between the genome size and a competence for induction of direct somatic embryogenesis, obtaining of stable transgenic lines by genetic transformation of cell suspension culture and ISE in *M. truncatula*, development of regeneration protocols for efficient insertional mutagenesis based on *Tnt1* transposon and obtaining a collection of mutant lines in the model species *M. truncatula* and *L. japonicus*, identification of *MERE1* retrotransposon and prove its transposition during *in vitro* regeneration of *M. truncatula*, phenotypic evaluation of selected *Tnt1* insertion mutant lines under different growing conditions - *in vitro*, *in vivo*, hydroponic and aeroponic culture, construction of overexpression vectors, knockdown expression and analysis of promoter activity of genes (*MtF-box*, *GRAS*, *LAX3*, *ARFB3*, *DRP*, *HAC*), as well as constructs for (Tandem Affinity Purification) and BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) assays, studying the function of the gene encoding F-box protein in *M. truncatula* and *A. thaliana* using assays based on forward and reverse genetics.

The successful realization of the large-scale and complex scientific task defines Assoc. Prof. Anelia Iantcheva as a theoretically and methodologically very well-trained scientist who skilfully handles a wide range of methodological techniques in the field of plant biotechnology and functional genomics. The studies represent a complete cycle of analyses that are a prerequisite for achieving scientifically significant results, some of which contribute to the world biological science for the model species *M. truncatula* and *L. japonicus* and represent a unique foundation for improving valuable agronomic traits in cultivated legumes.

I support the contribution provided by Assoc. Anelia Iantcheva. As original and valuable for the practice and with a worldwide contribution, I accept:

- Development of protocols for direct and indirect somatic embryogenesis in model legumes and establishing asymmetry of the first cell division in suspension cultures of *M. truncatula* and *M. falcata* - initial start for the direct somatic embryogenesis process and follow-up of the whole process from single embryogenic cell to whole plant.

- Establishment of the genome size of diploid species of *Medicago* with Algerian origin and the relationship between genome size and the competence to induce direct somatic embryogenesis in a liquid medium;

- Creation of a collection of *Tnt1* insertion mutant lines in *M. truncatula* and *L. japonicus* based on newly developed protocols for efficient transposition, enriching the global gene bank with insertion mutant lines for subsequent genomic analyses and isolation of genes encoding valuable agronomic traits. In this respect, the original fish-bone insertion mutant line with an altered root morphology obtained by a mutation in the gene involved in nodule-formation (nodulin 21) is a strong evidence of the capabilities of the use of insertion mutants for isolation and characterization of genes with certain functions in the genome of legumes.

- Identification of a new retro-element MER1 in the genome of mutant lines in *M. truncatula*, which transpose during *in vitro* regeneration and can be used as marker in future analyses aimed at investigating the resistance of different legume crops to stress factors;

- The comparative functional study of a gene encoding the F-box protein in *M. truncatula* and *A. thaliana* based on phenotypic and omics assays showing its function in the synthesis of the branched amino acid leucine and cell cycle.

The dissertation is designed in accordance with the requirements of the Law on Development of the Academic Staff of the Republic of Bulgaria and the Rules for its implementation. The dissertation is written on 315 pages. The literature is extremely comprehensive, precise, contemporary, sound and related to the issues under development and includes 501 sources, 2/3 of which have been published since 2000, and the results are illustrated with 23 tables and 71 figures in the main text and supported by more 27 figures and 2 tables set out in Annexes 1 and 2.

After reading the dissertation, I have some comments related to the terminology in Bulgarian language used ("promoter plants", "development plants", etc.), which do not diminishes its value.

In connection with the dissertation, 11 publications were presented, 9 of which - in prestigious international journals with impact factor and 2 - in journals with SJR, as well as chapters in two books.

The abstract reflects the main sections and results of the dissertation.

My personal impressions of Assoc. Prof. Iancheva date back to the dawn of her formation as a specialist in plant biotechnology, the successful defence of her PhD thesis and her development up to now, and I am pleased to note that an essential feature of her research work is the continuous enrichment of the methodological arsenal in line with the continuous updating of the problems and the upgrading of knowledge in the field of plant biotechnology and molecular biology. Over the years, she has emerged as an extremely responsible researcher and erudite scholar, and her specialization in Belgium and France and her involvement in international and national projects have resulted in many years of focused research, the result of which is this dissertation which was submitted to me for scientific opinion.

I have the following question to Assoc. Prof. Anelia Iancheva: "Which of the studied genes in the model legume species in this dissertation would be of breeding interest in the cultivated ones?"

CONCLUSION

Assoc. Prof. Anelia Iancheva's dissertation is a serious and noteworthy study in the field of plant biotechnology and comparative functional genomics, requiring rich scientific knowledge and solid experimental experience. The results obtained are an invaluable resource for further in-depth research in this direction and the transfer of knowledge from model to cultivated legumes. The dissertation fully meets the requirements of the Law for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its implementation and the Rules of the Agricultural Academy for the acquisition of the scientific degree "Doctor of Sciences".

Based on the scientific and applied importance of the results and contributions obtained, and the prospects they reveal for enhancing the effectiveness of modern genomic approaches to address fundamental and applied issues, I am convinced of my positive assessment and I allow myself to recommend to the Distinguished Scientific Jury to award Assoc. Prof. Anelia Veneva Iancheva the scientific degree "Doctor of Sciences" in the professional field 4.3 Biological Sciences, scientific specialty "Genetics".

Member of the Scientific Jury:

September 5, 2019

/ prof. Dr. Elena Todorovska

