

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната степен „Доктор на науките” в професионално направление **4.3. Биологически науки**, научна специалност Физиология на растенията

Автор на дисертационния труд: проф. д-р Виолета Борисова Великова от ИФРГ-БАН

Тема на дисертационния труд: Физиологична роля на биогенния изопрен в растенията

Рецензент: проф. д-р Андон Василев Андонов от Аграрен университет – Пловдив, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Физиология на растенията, определен за член на научното жури със Заповед № 971 / 17.12.2019 г. на Директора на ИФРГ-БАН.

1. Кратки биографични и наукометрични данни за дисертанта

Виолета Великова придобива магистърска степен по Биология в Биологическия Факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 1986 г. и образователна и научна степен „доктор“ по Физиология на растенията в ИФР-БАН през 1998 г. С ИФРГ я свързва повече от 30 годишна трудова дейност, по време на която кариерното ѝ развитие преминава през заемане на различни професионални позиции - от специалист-биолог (1988-1998), през научен сътрудник II-I ст. (1999-2006) и ст. н. сътрудник / доцент (2006-2012) до професор (2012). Към настоящия момент проф. Великова е председател на Научния съвет на ИФРГ и ръководител на Лабораторията „Фотосинтеза – активност и регулация“. Тя е специализирала във водещи изследователски центрове в Италия, Германия, Великобритания, Португалия и Гърция с финансова подкрепа от престижни фондации и програми като Александър фон Хумболт, Мария Кюри, НАТО и др. Член е на Съюза на учените в България, Федерацията на Европейските дружества по растителна биология (FESPB) и на Дружеството по експериментална биология (SEB).

Необходимо условие за придобиване на научната степен „доктор на науките“ е кандидатът да отговаря на минималните национални изисквания, минималните изисквания на БАН и в конкретния случай на специфичните изисквания на ИФРГ за професионално направление 4.3. Биологически науки. Минималните наукометрични данни за тази научна степен са 100 точки от научни трудове - монография или публикации, реферирани в базите данни *Web of Science* и *Scopus*, и 100 точки от цитирания на трудовете в тях. Представената наукометрична справка на проф. д-р Виолета Великова показва, че тя отговаря на минималните изисквания и значително ги надвишава. Във връзка с дисертационния си труд проф. Великова е представила 20 научни публикации (19 в категория Q1 и 1 в Q2), които

формират 495 точки. Забелязаните цитирания на тези публикации в посочените бази данни към 1.11.2019 г. са 1159, които формират 2318 точки.

2. Актуалност на разглеждания в дисертационния труд научен проблем

Проблемът за биогенния изопрен, отделян от растенията в атмосферата, е актуален в поне два аспекта.

В *екологичен аспект*, неговата актуалност се свързва с ролята и значението на изопреновите емисии за тропосферната химия и промените в климата. Растенията отделят изопрен в атмосферата, който в присъствие на светлина, азотни оксиди и хидроксилни радикали иницира реакции, водещи до формиране на редица фотохимични продукти с токсичен ефект и до увеличаване концентрацията на парникови газове, както и до натрупване на вторични аерозолни частици. Посочените негативни ефекти променят физичните и химични свойства на атмосферата, в това число качеството на въздуха. Това мотивира необходимостта от изследвания върху зависимостта на биогенните изопренови емисии от основни екологични фактори с цел по-прецизна прогноза на процесите в атмосферната химия, свързани с настъпващите промени в климата.

Актуалността на втория, *биологичен аспект* на проблема, се основава на предполагаемата физиологична роля на изопрена в защитата на растенията от различни абиотични стресови фактори. При оптимални условия на развитие растенията „губят“ 1-2% от асимилирания при фотосинтезата въглерод за синтез на изопрен, но при стресови ситуации този процент многократно нараства. Тъй като енергетичният разход за синтеза на изопрен е висок (за синтеза на 1 молекула изопрен се изразходват 20 молекули АТФ и 14 молекули НАДФ-Н), логичен е въпросът за ползата на растенията от този вторичен метаболит, както и за механизмите, чрез които тя се реализира. Дисертационният труд на проф. Великова дава в голяма степен отговор на тези въпроси чрез предоставяне на значителен обем оригинални научни данни и тяхната задълбочена дискусия.

3. Аналитична характеристика на дисертационния труд

1. Обем и структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем от 422 страници и включва следните раздели: Увод (2 стр.), Литературен преглед (18 стр.), Цел, хипотези и задачи (2 стр.), Подходи и методи на изследване (8 стр.), Резултати и обсъждане (94 стр.), Заключение (2 стр.), Приноси (4 стр.), Цитирана литература (20 стр.) и Приложение (272 стр.). Изключение от традиционната структура на дисертационен труд прави само раздела Приложение. В него са представени 20^{-те} научни публикации на дисертантката по темата на дисертационния труд. Дисертационният труд е написан на висок научен стил. Изложението е стегнато, ясно и улеснено от подходящ списък на съкращенията. Цитирани са общо 379 литературни източници.

2. Литературен преглед

В литературния преглед е представена информация за екологичния и биологичния аспект на разглеждания проблем. Той е аналитичен, критичен и достатъчно информативен. Основните въпроси са фокусирани върху: (●) Емисиите на изопрен от растенията; (●) Ролята на изопрена в атмосферната химия; (●) Влиянието на абиотични фактори на средата върху изопреновите емисии и (●) Антиоксидантните и термозащитни ефекти на изопрена в растенията. Интересен детайл е включването в литературния преглед на факти от 8 научни публикации на дисертантката, свързани с дисертационния труд. Считаю, че литературният преглед отразява коректно съвременните представи за проблема с биогенния изопрен.

Дисертантката заключава, че физиологичната роля на изопрена в растенията се свързва с възможните му защитни функции в условия на абиотичен стрес. Същевременно, известните факти, че не всички растения отделят изопрен, както и че влиянието му е сезонно-, възрастово- и температурно-зависимо, показват, че проблемът не е напълно изяснен. Тя счита, че предполагаемите механизми на изопреновото действие в растенията са само частично експериментално потвърдени, което мотивира провеждането на изследвания със следната цел и задачи.

3. Цел, задачи, хипотези

Основната цел на изследването е „изясняване на физиологичната роля на биогенния изопрен като средство за защита на растенията срещу абиотичен стрес“.

Поставената цел е базирана върху посочените в литературния преглед предположения и факти за защитното действие на изопрена в растенията, но при планирането на изследванията, те са обобщени, доразвити и формулирани под формата на следните работни хипотези:

(●) Изопренът има съществено значение на толерантността на растенията към широк кръг от различни абиотични стресови фактори, което се проявява на различни функционални нива в растителния организъм.

(●) Ендогенният изопрен влияе върху акумулирането на реактивни азотни и кислородни продукти в клетките, и по този начин определя отговора на растенията при стрес.

(●) Биогенният изопрен като част от антиоксидантната система на растенията действа синхронизирано с други защитни метаболити, осигурявайки по-добра защита на растенията при стрес.

За постигане на поставената цел са формулирани 4 логично свързани задачи.

(●) Чрез първата задача се цели да се набавят преки експериментални доказателства за възможните защитни ефекти на изопрена в растенията в отговор на различни абиотични фактори (озон, синглетен кислород, висока температура, висока концентрация на CO₂ в атмосферния въздух, засушаване, антропогенно замърсяване).

(●) Втората задача е насочена към изясняване на взаимодействията между ендогенния изопрен и сигналната молекула азотен оксид (NO) при реализация на отговора на растенията към окислителен стрес.

(●) Чрез третата задача се търсят косвени доказателства за защитната роля на изопрена в растенията като се изучават последствията от инхибирането на изопреновата емисия върху хлоропластния протеом, липидния и мастнокиселинен състав на фотосинтетичните мембрани и ултраструктурата на хлоропластите.

(●) Четвъртата задача изяснява взаимовръзката между изопреноидите и фенилпропаноидите в защитната система на растенията при оптимални и стресови условия.

4. Подход и методи на изследване

В изследванията си върху разработвания проблем дисертантката е използвала широк кръг от *in vivo* и *in vitro* опитни постановки и методи за анализ, които са подбрани мотивирано, съобразно спецификата на поставените задачи. Считаю, че избраният методологичен подход за съчетаване на различни опитни постановки е правилен, защото позволява, от една страна, да се направи комплексна характеристика на изследвания проблем, а от друга страна, да се избегнат ограниченията, които всяка една експериментална постановка носи.

Изследванията включват опити с растителни видове с различна способност да отделят изопрен [напр., силният емитер обикновена тръстика (*Phragmites australis*) и неотделящият изопрен вид японска трева *Hakonechloa macra*], както и опити с видове с променена способност на синтез на изопрен, в резултат на генна манипулация - *Arabidopsis thaliana*, тютюн (*Nicotiana tabacum*, cv. Samsun) и сива топола (*Populus x canescens*). В част от експериментите са използвани листа с манипулирана изопренова емисия чрез третиране с фосмидомицин, както и листа, развити в атмосфера с повишена концентрация на CO₂, листа в различен етап на онтогенетичното си развитие, а така също и листа от различни по възраст растения.

Изследванията са извършени с помощта на съвременни физиологични, биохимични, протеомни и други методи за анализ и високочувствителна научна апаратура, които несъмнено повишават обективността на получените резултати. Сред тях бих отбелязал фотосинтетичният газообмен, хлорофилната флуоресценция, биофизичните показатели на термостабилност на тилакоидните мембрани (кръгов дихроизъм, електрохромно отместване при 515 nm, термолуминисценция), активността на антиоксидантни ензими и антирадикаловата активност в листата, имуноензимното определяне на абсцисиева киселина, хроматографското определяне на емисиите на летливи изопреноиди, индивидуални каротеноиди и фенилпропаноиди, липидния профил на фотосинтетичните мембрани, хемилуминесцентното определяне на емисиите на NO в листата, използването на нови техники за количествен и качествен анализ на растителни белтъци, изследването на хлоропластна ултраструктура чрез трансмисионна електронна микроскопия и др.

Получените резултати са обработени с утвърдени методи за вариационно-

статистически анализ. Достоверността на разликите в изследваните параметри между отделните варианти е доказана основно чрез дисперсионен анализ (ANOVA), последван от тест на Tukey или Student. В някои от изследванията резултатите са подложени на мултивариантен анализ със статистическите методи, известни като Анализ на главните компоненти (PCA – Principal Component Analysis) и Анализ на ортогоналните частни най-малки квадрати (OPLS - Orthogonal Partial Least Squares).

5. Резултати и дискусия

Разделът е диференциран на 7 подраздели, които завършват със заключения. Данните са представени чрез 67 индивидуални и съставни фигури и 1 таблица. В раздела са представени и дискутирани подбрани основни данни, а останалите резултати и съпътстващата информация са отразени в приложените научни публикации. Приемам възприетия подход за представяне на данните за по-подходящ за такъв дисертационен труд. Същевременно, е необходимо да отбележа, че той е в съответствие с изискванията, отразени в член 3.2. на Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИФРГ.

В резултат на проведените проучвания е получена в значителен обем нова научна информация за физиологичната роля на изопрена в растенията. Тя е установена на различни функционални и структурни нива в моделните растителни обекти и в интегрален вид предоставя убедителни доказателства за защитната функция на изопрена в растения, подложени на абиотичен стрес. Основните резултати, които подкрепят издигнатите хипотези, са следните:

- Ендогенният изопрен има доказана способност да повишава устойчивостта на растенията към окислителен стрес, причинен от озон, синглетен кислород, висока температура, засушаване и антропогенно замърсяване с тежкия метал Ni.

- Защитната роля на изопрена в значителна степен се дължи на способността на тази молекула да влияе върху организацията на тилакоидните мембрани и да намалява образуването на реактивни кислородни и азотни форми.

- Изопренът подобрява термостабилността на тилакоидните мембрани.

- Изопренът оказва допълнителна „антиоксидантна“ роля заедно с други летливи и нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди, осигурявайки по-добра защита на растенията при стресови условия и др.

Получаването на тези завидни по обем и качество резултати не би било възможно без комфортно финансиране на научните изследвания. Проф. Великова е финансирала изследванията си чрез редица конкурсно спечелени научни проекти, финансирани от Фонд „Научни изследвания“ (ТКБ-1604/2007-2010; Б02-8/2014-2017), МОН (Д01-168/2014-2016). ЕБР проекти с Италия (2004-2006; 2007-2009; 2010-2012) и Унгария (2010-2012).

4. Приноси на дисертационния труд

В резултат на проведеното комплексно изследване са получени резултати, основната част от които имат иновативен характер и могат да бъдат разглеждани като приноси за науката. Прието е, приносите да се диференцират в няколко групи, а именно като новост за науката, методични и приложни. В настоящия дисертационен труд са формулирани 15 приноса, които напълно приемам. Основната част от тях отнасям към групата „новост за науката“, по-конкретно, към подгрупите: (●) Формулиране и обосновка на нова хипотеза и (●) Доказване с нови средства на съществени нови страни на вече съществуващи хипотези. Най-важните приноси, които бих искал да подчертая, са следните:

- ✓ За първи път е демонстрирано, че ендегенният изопрен има важна защитна роля при *Phragmites australis* (тръстика) в условията на озонов стрес, като ограничава натрупването на водороден пероксид и ограничава липидното пероксидиране на клетъчните мембрани.
- ✓ Установено е, че изопренът има протектиращо действие срещу синглетен кислород. Гасенето на синглетен кислород от изопрена се обяснява с наличието на спрегнати двойни връзки в изопреновата молекула, което улеснява преноса на енергия и топлинната дисипация.
- ✓ За първи път са представени експериментални данни, пряко подкрепящи хипотезата за мембранно-стабилизиращата роля на изопрена. Чрез използването на различни биофизични техники е показано, че изопренът подобрява интегритета и функционалността на тилакоидните мембрани при високо-температурен стрес.
- ✓ За първи път чрез прилагането на нов метод за протеомни изследвания (изотопно кодирана техника за маркиране на белтъци) е установено, че инхибирането на изопреновата биосинтеза и емисия променя хлоропластния белтъчен профил, което отразява структурни промени във фотосинтетичните мембрани и намаляване на устойчивостта на растенията към окислителен стрес.
- ✓ За първи път е показано, че изопренът ограничава натрупването на азотен оксид (NO) в листа на *Phragmites australis*, изпитващи озонов стрес. Значително количество NO се акумулира само в мезофилната тъкан на изопрен-инхибираните листа, но не и в изопрен-отделящите листа, показвайки възможността на изопрена да регулира нивото на активни кислородни и азотни форми. Това може да бъде ефективен механизъм за контрол на нивото на вредни реактивни форми при стрес.

5. Критични бележки и въпроси

Нямам критични бележки към дисертационния труд.

6. Оценка на автореферата

Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

7. Оценка на публикациите по дисертационния труд

Дисертантката е представила 20 научни публикации, свързани с разработката на дисертационния труд. Тя е първи автор в 13 публикации, а в 7 от тях е и кореспондиращ автор. Кореспондиращ автор е и на публикация № 20, в която не е първи автор. Посочените факти недвусмислено показват водещата ù роля при извеждането на научните експерименти и написването на публикациите, което е декларирано в някои от тях (напр. в № 17). Както вече беше отбелязано, всички публикации са в реномирани списания с висок импакт фактор (категории Q1 и 1 в Q2). Общият импакт фактор на публикациите е 86.85.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационния труд на проф. д-р Виолета Великова показва, че тя притежава задълбочени познания и професионални умения по научната специалност Физиология на растенията, които ù позволяват да провежда изследвания върху важни за обществото и науката проблеми, какъвто е проблема за физиологичната роля на биогенния изопрен в растенията. Той съдържа значими научни резултати, представляващи оригинален принос за науката и отговарящи на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за приложение на ЗРАСРБ и Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИФРГ. Резултатите от дисертационния труд са получили международно признание и висок отзвук сред професионалната общност, тъй като са публикувани в научни списания с изключително висок рейтинг и са многократно цитирани.

Посоченото дотук ми дава основание като рецензент да оценя положително дисертационния труд на проф. д-р Виолета Великова и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да ù присъдят научната степен „Доктор на науките” в професионално направление 4.3. Биологически науки и научна специалност Физиология на растенията.

10.03.2020 г.

Рецензент:

/проф. д-р Андон Василев/